

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA**



**FISURAS LABIO-PALATINAS Y FORTIFICACIÓN DE LA
HARINA CON ÁCIDO FÓLICO EN CHILE.**

DRA. MARÍA ANGÉLICA PAULOS PAROT

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN SALUD PÚBLICA

PROFESOR GUÍA DE TESIS: DRA. PAULINA PINO

Santiago, Julio, 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
ESCUELA DE SALUD PUBLICA

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE
MAGISTER EN SALUD PÚBLICA**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister en Salud Pública presentada por el candidato (la)

MARÍA ANGÉLICA PAULOS PAROT

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **MAGISTER EN SALUD PÚBLICA** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día _____

Dr. _____

Director de Tesis

Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina d la Universidad de Chile.

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dr. _____

Dr. _____

Dr. _____

DR _____
Presidente Comisión de Examen

*...Quiero agradecer
especialmente a mi familia y a
mis padres por el apoyo, amor,
paciencia y ternura durante mi
carrera profesional ... bueno en
realidad durante toda mi vida.*

AGRADECIMIENTOS:

- Dra. Paulina Pino por depositar la confianza y apoyo a esta idea y orientarme en el proceso de realización de esta tesis.
- Profesor Gabriel Cavada Chacón por su apoyo en el análisis estadístico de esta tesis.
- Dr. Eugenio Maul Fonseca por apoyarme incondicionalmente en mi carrera.
- A los profesores del Programa de Magister de Salud Pública.
- A los profesores del Programa de Medicina, Cirugía Infantil y a todos los que han dado la confianza para operar juntos y aprender de ellos.

ÍNDICE	Página
Resumen.....	08
Abstract.....	09
Introducción.....	10
Marco Teórico.....	12
• Fisuras Labio-palatinas.....	12
• Factores ambientales y Acido Fólico.....	13
• Nivel en que actúa el Ácido Fólico en el desarrollo Fetal.....	16
• Fortificación de la Harina con Acido Fólico y Defectos del Tubo Neural.....	17
• Fisuras Labio-palatinas y Defectos del Tubo Neural.....	19
• Ácido Fólico en Multi-vitamínicos y Fisuras Labio-palatinas.....	21
• Ácido Fólico, Fortificación y Fisuras Labio-palatinas.....	21
• Relación Dosis-Efecto de Ácido Fólico y Recurrencia de Fisuras.....	24
• Eventuales Efectos de Adversos de la Fortificación.....	25
• Justificación de la Realización de la Tesis y Aspectos Éticos Relevantes....	26
Pregunta de Investigación.....	28
Objetivos Generales y Específicos.....	28
Hipótesis.....	29
Métodos	30
• Variables y su Operacionalización.....	31
• Recolección e Imputación de Datos.....	33
• Análisis Estadístico.....	34
• Marco de Referencia de Modelos Estadísticos utilizados.....	34
Aspectos Éticos	38
Resultados	39
• Análisis del período 1986-2012.....	39
• Análisis del período 2004-2011.....	43
• Análisis de tendencia de la variable respuesta y variables explicatorias.....	49
• Análisis Univariado.....	52
• Análisis Multivariado.....	55
Discusión	57
Conclusión.....	62
Bibliografía.....	63

RESUMEN

Introducción: El efecto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en la incidencia de Fisuras labio-palatinas (FLP) persiste en discusión. En Chile, la fortificación de harina en el año 2000 (FAF) pudo haber producido un cambio.

Objetivo: Explorar la tendencia de la Tasa de Egresos hospitalarios de Fisura Labio-Palatinas (TEHFLP) en menores de 1 año durante 1986-2012, en Chile.

Métodos: Estudio ecológico descriptivo y analítico.

1.- Obtención de Egresos Hospitalarios del DEIS-MINSAL, durante 1986-2012, de menores de 1 año, con código CIE-10 Q350-379. Se incluyen otras variables como la incidencia de rubeola, % nacional de pobreza, % embarazadas obesas, y % de mujeres que consumen tabaco y alcohol.

2.- Calcular la TEHFLP en menores de 1 año de cada año.

2.- Explorar TEHFLP con Modelo MARS con programa "R", y cálculo del odds ratio (OR), comparando períodos Pre-fortificación (1986-1999) y Post-fortificación (2000-2010). Uso de Modelos Prais-Winsten y Mixtos, para ajuste de otras variables, en Stata11.2.

Resultados: TEHFLP muestra una disminución de 1,88 x 1000 rn en 1986-1996, versus 1.68 x 1000 rn en 2001-2012 (RR = 1.09 (IC 95% 1.05 – 1.14, p<0.001)). El modelo MARS identifica a el año 2003 como el año de cambio. En modelos Prais-Winsten y Mixtos, la variable que explica la tendencia es pre y post fortificación. Durante 2004-2011, existe disminución de egresos de fisuras de labio y aumento de fisuras de labio y paladar.

Conclusión: La disminución de TEHFLP es concomitante con la implementación FAF. TEHFLP es distinto a incidencia, dado mal registro de mortinatos, polimalformados y fisuras aisladas de paladar, y/o múltiples cirugías. Se hace imperiosa la necesidad de un registro nacional de malformaciones congénitas. En el último período existe disminución de egresos de fisuras de labio y aumento de las fisuras de labio y paladar, lo cual requiere de mayores estudios.

ABSTRACT

Introduction: The effect of food fortification with folic acid in the incidence of orofacial cleft (OFC) remains under discussion. In Chile, the fortification of flour in 2000 (FAF) could make a difference.

Objective: To calculate hospital discharge rate of cleft lip and palate (HDRCLP) in children under 1 year and explore whether there was a decrease.

Methods: descriptive and analytical ecological study.

1. Obtaining Hospital Discharge from DEIS-MINSAL during 1986-2012, of children under 1 year of age, with code ICD-10 Q350-379. Other variables such as the incidence of rubella, national poverty, % obese pregnant, and % of women who smokes and used alcohol is included.
2. Calculate the HDRCLP in children under 1 year of age, of each year.
2. Browse HDRCLP with Generalized Additive Models (MARS) in "R" program and calculating the odds ratio (OR), comparing Pre-fortification periods (1986-1999) and post-fortification (2000-2010). Prais-Winsten Models and Mixed Models are used to adjust other variables in Stata11.2.

Results: HDRCLP shows a decrease of 1.88 x 1000 rn in 1986-1996 versus 1.68 x 1000 rn in 2001-2012 (RR = 1.09 (95% CI 1.05 - 1.14, p <0.001)). The MARS model identifies 2003 as the year of change. In Prais-Winsten Models and mixed models, the variable that explains the trend is pre- and post-fortification. During 2004-2011, there is a decrease on cleft lip discharges and an increase on cleft lip and palate discharges.

Conclusion: the HDRCLP decrease is concomitant with FAF. HDRCLP is different from incidence, given bad record of stillbirth, multiple malformations and isolated palate cleft, and / or multiple surgeries. It becomes imperative to do a national registry of congenital malformations. In the last period there is a decrease discharges of cleft lip and increase in cleft lip and palate, which requires further study.

INTRODUCCIÓN:

Las Fisura Labio-palatinas son defectos congénitos mayores que tienen una etiología genética y ambiental compleja. Se deben a una alteración en la fusión de los tejidos que forman el labio y/o paladar durante el desarrollo embrionario. Forman un espectro de malformaciones que incluyen defectos parciales o totales, uni o bilaterales de labio y/o paladar.(1,2) Hasta el día de hoy, se desconoce a cabalidad la etiología y los procesos fisiopatológicos que desencadenan el desarrollo de esta malformación. Se ha postulado que existen factores genéticos y ambientales que interactúan para desarrollar este defecto. Alcohol y tabaco materno y otros químicos, como Fenitoína, Talidomida, Ácido Valproílico y pesticidas como Dioxina, se han planteado como teratógenos y pudieran estar asociados en desarrollar esta malformación.(3) La contribución de factores nutricionales se ha planteado como un factor causal, siendo el déficit de ácido fólico uno de los elementos que aumentaría el riesgo.(4)

Las fisuras labio-palatinas tiene asociado un aumento en la frecuencia de otras condiciones que pueden afectar el desarrollo general de la persona. Existen mayores probabilidades de tener déficit auditivo, dificultad en la alimentación, dificultades en el lenguaje, alteración en el desarrollo de los elementos faciales y dentales.(5,6) Estas alteraciones pueden dejar secuelas estéticas y/o funcionales que acarrear un eventual déficit cognitivo, baja autoestima, baja capacidad de integración social y una mala calidad de vida, no sólo para el paciente, sino también, para su familia y entorno.(7)

El tratamiento involucra varias cirugías reconstructivas, y un manejo multidisciplinario de profesionales, en los cuales se incluye al cirujano plástico y/o máxilo-facial, ortodoncista, fonoaudiólogo, psicólogo, terapeuta ocupacional, kinesiólogo, enfermeras, anestesistas, otorrinolaringólogo, asistente social, entre otros. Los tratamientos comienzan en el período de recién nacido con la ortopedia prequirúrgica y apoyo durante la lactancia y la alimentación, y se completan en la adolescencia, cuando las modificaciones quirúrgicas del esqueleto óseo facial, puedan ser las definitivas. Estos tratamientos conllevan un alto costo para el sistema de salud y las familias involucradas.(1,6)

Por otra parte, una de las medidas más eficaces para en prevención primaria de los defectos congénitos, especialmente los defectos del tubo neural, ha sido la ingesta peri-concepcional del ácido fólico.(8–10) Se ha visto disminución de la ocurrencia de defectos del tubo neural con suplementación de ácido fólico aislado(11) o asociado a otras vitaminas,(12) y a través de fortificación de alimentos como cereales o harina.(13)

Actualmente el Sistema de Salud Público (U.S. Public Health Service) y el Centro de Control de Enfermedades y Prevención de los Estados Unidos (Centers of Disease Control and Prevention CDC) recomiendan una ingesta de 400µg/día adicionales de ácido fólico para mujeres de edad reproductiva, para lograr efectos preventivos.(5,9)

En el caso de las fisuras labio-palatinas, la evidencia en cuanto al efecto que presenta la ingesta de ácido fólico es aún discordante y se encuentra en activa discusión en la literatura. En estudios observaciones, principalmente estudios tipo casos y controles, que han buscado evaluar el efecto del uso de los multivitamínicos y del ácido fólico en la incidencia de fisuras labio-palatinas, sugieren un potencial rol preventivo del ácido fólico, pero la evidencia persiste siendo no concluyente.(5,9,12–21)

Esta tesis explora los eventuales efectos sobre la tasa de egresos hospitalarios, como valor aproximado a incidencia de fisuras labio-palatinas, que puede haber tenido la incorporación de ácido fólico en la fortificación de la harina en Chile, implementada el año 2000.

MARCO TEÓRICO:

En este marco teórico entregaremos una puesta al día de los factores que se han encontrado asociados a la incidencia de fisuras labio-palatinas, haciendo especial hincapié a la evidencia que existe en torno a los factores nutricionales y a la fortificación de alimentos con ácido fólico.

Fisuras Labio-Palatinas

Las fisuras labio-palatinas ocurren cuando el labio o el paladar no se cierra en el desarrollo embrionario, dejando un defecto que perdura como una falta de continuidad en el labio superior y/o en el paladar. Las Fisuras labio-palatinas son un espectro de malformaciones, que involucran distintos grados de severidad, con diferentes compromisos de las estructuras anatómicas del labio superior, paladar primario o paladar secundario, las cuales pueden ser uni o bilaterales, totales o parciales. Muchos autores las han tratado de clasificar esta malformación, según criterios embriológicos, anatómicos, odontológicos, quirúrgicos, etc. La clasificación de Davis y Ritchie, agrupa en tres a las fisuras labio-palatinas: I fisura de labio, II fisura de paladar y III fisura de labio y paladar.(1,22) Otra clasificación, agrupa a las fisuras labio-palatinas en 2: fisuras de labio con o sin paladar y las fisuras de paladar aislada. Las fisuras de labio con o sin paladar y las fisuras de paladar, son dos entidades distintas dado que presenta una embriología y un patrón epidemiológico diferente.(23,24)

La incidencia de fisuras labio-palatinas varía entre 1 cada 500 recién nacidos a 1 cada 1500 recién nacidos, y muestra una gran variación geográfica.(5) En nuestro país 1 cada 600 nacidos vivos nacen con esta malformación anualmente (tasa de incidencia de 1,7 por 1.000 recién nacidos vivos).(1,6) Existen datos que sugieren que la prevalencia de las fisuras labio-palatinas es mucho más frecuente en la población Mapuche, que para el resto de la población nacional.(25,26) Pero se desconoce si esta asociación se debe a factores principalmente genéticos o a variables culturales. Además, las fisuras de labio con o sin paladar son más frecuentes en varones y las fisuras de paladar son más frecuentes en mujeres.(1) Se plantea que la causa por la cual las fisuras de paladar son más frecuentes en mujeres, es por el cierre de paladar secundario es más tardío en las mujeres, durante el desarrollo fetal.(23)

Las fisuras labio-palatinas -70 a 80% de los casos- suelen presentarse aisladamente, es decir, sin otras malformaciones congénitas en el mismo paciente.(1) Ante la presencia de otros defectos se plantea la presencia de un síndrome o a la exposición de un teratógeno (Fisuras Labio-palatinas sindromáticas). Se reconocen más de 500 síndromes con fisuras faciales, algunos de los cuales involucran genes, mutaciones o aberraciones cromosómicas conocidas.(3) Dentro de las fisuras labio-palatinas sindromáticas más frecuentes se encuentran pacientes con Síndrome de Van der Woude y Síndrome Velo-cardio-facial, donde la mutación del factor 6 regulador de interferón (IRF6, acrónimo para interferon regulador factor 6), y delección de 22q11.2, respectivamente, son los causantes de estas anomalías.(3)

Múltiples estudios han tratado de identificar genes involucrados en la formación de la fisura labio-palatina no sindromática. Entre estos se encuentran IRF6, locus próximo a 8q24, MAFB, ABCA4 y VSX1.(3,27,28) Está en activa investigación la presencia de otros genes que puedan estar involucrados en el desarrollo de las Fisuras Labio-palatinas. El gen MTHFR concentra el mayor número de publicaciones en los últimos años, y aún no está claro cómo actúa en el desarrollo de la fisuras labio-palatinas. Este gen es productor de la enzima metil-ene-tetra-hidro-folato reductasa, que participa en el metabolismo de metionina, elemento fundamental en los procesos de metilación. (3,29,30) La reducción de la función de esta enzima se encuentra asociada a una menor concentración de ácido fólico, hiper-homocisteinemia, defectos del tubo neural (9) y aparentemente también con las fisuras labio-palatinas.(17)

Las fisuras labio-palatinas se acepta que tienen una etiología multi-causal, donde los factores ambientales y genéticos interactúan, para desarrollar la malformación.(7,29–30) Describiremos a continuación cuales son factores ambientales más citados en la literatura, como agentes asociados de las fisuras labio-palatinas.

Fisuras Labio-palatinas y factores ambientales:

Varios factores ambientales se plantean como contribuyentes en el desarrollo de las fisuras labio-palatinas. Entre estas se encuentran la exposición durante el embarazo al tabaco, alcohol, obesidad, anticonvulsivantes, pesticidas, drogas ilícitas, infecciones virales, efectos estresantes, fiebre y deficiencias nutricionales.(5,28,32–34)

El consumo de tabaco durante el embarazo, ha sido una de las variables más estudiadas y las últimas revisiones adjudican al tabaco un aumento de hasta 1,48 veces la frecuencia de fisuras de labio con o sin paladar (OR 1,48, IC 95% 1,36;1,61)(33–35) y en 1,32 veces (OR 1,32, IC 95% 1,1;1,62) la frecuencia de fisuras de paladar.(33,36) El tabaco, por su parte, se ha visto que está asociado con menores niveles de folato plasmáticos, lo que pudiera deberse a hábitos alimentarios y de estilo de vida diferente, dado que los fumadores consumen menor cantidad de alimentos ricos en folatos.(33,37)

Existe evidencia limitada que asocia consumo de alcohol y desarrollo de fisuras labio-palatinas. La evidencia existente corresponde a estudios observacionales, principalmente estudios casos y controles, los cuales pueden presentar sesgo y confusión. El metanálisis de Molina-Solana R. et al. presenta una asociación débil entre consumo de alcohol durante el embarazo y fisuras labio-palatinas (OR = 1,28, IC 95% 0,98;1,66).(34) Según Munger et al. esta asociación pudiese tener una relación dosis-respuesta (33) y en el artículo de DeRoo et al, plantean que la forma de consumo, también puede cambiar la fuerza de esta asociación. DeRoo et al. encontró que las mujeres embarazadas que consumen más de 5 copas durante una noche, también pudiesen tener mayor asociación a desarrollar fisuras de labio y paladar en su feto.(38) A su vez, igual que el consumo de tabaco, el consumo de alcohol también se ha asociado con niveles de folatos plasmáticos más bajos.(33,39) Los mecanismos fisiopatológicos que pudiesen explicar la asociación entre consumo crónico de alcohol y disminución de los niveles de folatos plasmáticos son una menor capacidad absorbente de folatos a nivel intestinal; menor capacidad de almacenaje hepático y excreción de folato urinarios aumentados.(39) No sólo se ha encontrado alteración de los niveles de folato en consumo crónico de alcohol, sino también, se ha identificado una disminución de los niveles de folatos asociados a consumo agudo de alcohol, el cual no tiene un mecanismo identificado aún.(39)

La obesidad ha sido otro factor propuesto que pudiese presentar asociación con el desarrollo de las fisuras labio-palatinas. Se ha planteado que la obesidad actúa a través de mecanismos semejantes a la diabetes y la intolerancia a la glucosa para desarrollar malformaciones congénitas en el feto. Entre estos mecanismos se plantea estrés hipóxico del feto durante hiperglicemias e hiperinsulinemias; aumentos de productos glicosilados que producen daño a nivel de la síntesis de DNA; producción de una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado en relación al tejido adiposo; o

aumento de la reserva de sustancias de desecho en el tejido adiposo como la dioxina. Se ha encontrado una asociación débil, con un OR cercano a 1,26 (OR = 1,26, IC 95%1,07;1,49), según el metanálisis de Molina-Solana R. et al.(34,40) La obesidad se plantea también como un probable de factor de riesgo para los defectos del tubo neural, con un RR que se plantea que se encuentra en el rango de 1,5-3,5.(41)

Dentro de los déficit nutricionales, se ha postulado la existencia de una asociación entre fisuras labio-palatinas con el déficit de zinc(42,43) y con el déficit de vitaminas del grupo B (vitaminas B9, B6 y B12).(28,34,44) El zinc es un nutriente fundamental para la correcta acción de varias enzimas y hormonas, que son críticas para el desarrollo fetal del sistema nervioso central.(42) Hozyasz et al. en un estudio caso y control encuentra que niveles de zinc en sangre iguales o menores a 47,1 $\mu\text{mol/L}$ se presentan 2,5 veces más frecuentemente en madres de niños con fisuras faciales (95% CI 1,03–6,23; $p < 0,05$). (43) Las vitaminas B6, B12 y B9, tienen un función fundamental en los ciclos de metilación y se ha adjudicado que su deficiencia pudiesen crear alteraciones en la embriogénesis. En el caso de la vitamina B6, es una coenzima que se encuentra relacionado con el metabolismo de las aminoácidos y en procesos de metilación.(45) Vitamina B6 participa en la transformación de homocisteína en cistationina y cisteína, y su déficit puede llevar a niveles elevados de homocisteína, al igual que en los casos de déficit de vitamina B9 (ácido fólico).(37,44,46) La hiper-homocisteinemia tiene un efecto tóxico en el endotelio y es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares en el adulto, pero su efecto a nivel del feto aún se encuentra en estudio.(44) Wong et al. encontró que el niveles bajos de vitamina B6 y altos niveles de homocisteinemia se encuentran asociado con el desarrollo de Fisuras Labio-palatinas.(46)

La vitamina B12 permite la transformación de homocisteína en metionina dado que participa como cofactor de la enzima metionina-sintetasa. La deficiencia de vitamina B12 produce anemia megaloblástica, al igual que en los casos de déficit de folatos.(37,41) Por eso se ha planteado que la fortificación con ácido fólico en los alimentos pudiese encubrir la presencia de anemia megaloblástica del adulto por déficit de vitamina B12 y aumentar sus consecuencias a nivel neurológico.(47,48) Esto se discutirá con mayor detalle más adelante. Dado que el déficit de B12 pueden alterar el ciclo del folato, se especula que pudiese participar en el desarrollo de defectos del tubo neural y en Fisuras Labio-palatinas. Existe evidencia que sugiere que el déficit B12

puede desencadenar defectos del tubo neural, y actualmente la recomendación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos es de ingerir 2,6 ug/d de vitamina B12, para mujeres en edad reproductiva.(49) La evidencia científica es insuficiente actualmente para adjudicarle un rol preventivo en el caso de Fisuras Labio-palatinas.(41,50)

Especial interés ha presentado el déficit de folatos o B9, en el desarrollo de Fisuras Labio-palatinas, luego de observar la disminución en la ocurrencia de otras malformaciones congénitas, cuando aumenta la ingesta de ácido fólico.(8,12,21) Se detallará más adelante cuales son los mecanismos fisiopatológicos relacionados con el desarrollo de defectos congénitos, especialmente con Fisuras Labio-palatinas.

Existen drogas que funcionan como teratógenos cuando la madre las consume durante el embarazo, especialmente en el primer trimestre y pueden desencadenar defectos en el desarrollo fetal y desarrollo de fisuras orofaciales. Entre éstas se encuentran los anticonvulsivantes y otros antagonistas de folatos, como cloranfenicol, metotrexato, fenobarbital, fenitoína, primidona, barbitúricos, sulfasalazina, metformina y triamterene.(12,33) Esto sugiere que el metabolismo del folato es importante para el desarrollo fetal y crecimiento craneofacial.

Actualmente existe activa investigación sobre como los factores ambientales, del comportamiento y diferentes patrones genéticos, pueden afectar en forma directa o a través de la interacción con otras variables, en el desarrollo embrionario de las Fisuras Labio-palatinas.(29)

Describiremos a continuación cuales son los mecanismos propuestos, en los cuales afecta los folatos en el desarrollo celular y por lo tanto, pueden afectar el desarrollo embrionario.

Nivel en que actúa el Ácido Fólico en el Desarrollo Fetal

Los folatos, son vitaminas solubles en agua, que deben ingerirse en la dieta, dado que no puede ser sintetizada por el hombre. Se encuentran en vegetales de hojas verdes, frutas cítricas, legumbres y el hígado.(3) Por mucho tiempo se ha conocido la importancia de los folatos en el desarrollo embrionario.(29) El ácido fólico es una forma sintética de folato, y dado que es más estable y más fácil de absorber, se ha incorporado en los suplementos nutricionales. Luego de la absorción del ácido fólico,

éste se metaboliza en su principio activo, el tetra-hidro-folato, y entra en el ciclo metabólico del folato.(44) Este principio activo actúa a través de 2 vías principales; como cofactor en la metilación del DNA, y como cofactor en la síntesis de RNA, DNA, fosfolípidos, neurotransmisores y hormonas.

La metilación de DNA, es uno de los cambios epigenéticos que se producen después de la replicación del DNA y que determina la expresión de genes y mantención de la estabilidad del genoma.(51) Se ha planteado que la metilación inadecuada del DNA está asociada con el cáncer, el envejecimiento y fisuras labio-palatinas, así como otras condiciones de salud.(41,51) El déficit de folato y otras vitaminas, afectan las rutas de metilación del DNA y, por lo tanto, la expresión genética, de especial importancia durante el periodo peri-concepcional.(41) Recientes estudios comprueban que los patrones de metilación del DNA del feto se ven afectados por la suplementación materna de micronutrientes.(51) Este sería el pilar que explica el efecto de cómo los elementos nutricionales afectan los procesos epigenéticos del DNA.

El ácido fólico actúa también como cofactor en la síntesis purinas y pirimidinas, precursores en la formación de DNA y RNA y de otras sustancias como, fosfolípidos, neurotransmisores y hormonas.(28,52) Debido al crecimiento, maduración y proliferación celular del embrión, los requerimientos metabólicos de folatos se ven aumentados durante el embarazo y el periodo peri-concepcional y, por lo tanto, su déficit puede afectar el normal crecimiento de los tejidos y órganos del feto, generando malformaciones congénitas.(29,44)

Existen células especialmente sensibles al déficit de folatos. Las células derivadas de la cresta neural tienen una alta expresión de receptores de folatos en la membrana celular, lo cual refleja una alta demanda de folatos.(29) Estas células tienen un rol importante en el desarrollo facial y su detención de los procesos migratorios durante la embriogénesis se asocian a distintos fenotipos de defectos craneofaciales, incluidos las Fisuras Labio-palatinas.(53)

Revisaremos brevemente como el aumento de la ingesta de ácido fólico, en las mujeres de edad fértil, produjo una disminución de defectos del tubo neural y otras malformaciones congénitas, en Chile y en el Mundo.

Fortificación de la Harina con Acido Fólico y Defectos del Tubo Neural

En Chile, existe un programa exitoso de fortificación de alimentos. La harina de

trigo ha sido fortificada con Hierro, Tiamina y Riboflavina desde los años 1950.(54) En el año 2000, se implementó la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico(55), luego que se comprobara que la ingesta de ácido fólico disminuye el desarrollo de malformaciones del tubo neural en el feto.(8,18) La recomendación actual para las mujeres de edad fértil es de consumir 400µg de ácido fólico diario adicional, y continuarlo, al menos, hasta las 12 semanas de embarazo.(5,9) Luego de la fortificación de los cereales con ácido fólico en Estados Unidos y Canadá implementada en 1998, se logró una reducción de la incidencia de los defectos del tubo neural de 50%, aproximadamente.(56) El objetivo principal de la fortificación de la harina con ácido fólico en Chile era aumentar la ingesta de folatos, especialmente en mujeres en edad fértil y reducir la prevalencia de los defectos del tubo neural.(57) Los análisis de calidad del programa de fortificación de la harina, en Chile, observa que todos los molinos muestreados fortifican la harina, sin embargo el desempeño de los molinos en el proceso de fortificación presentan una altísima variabilidad tanto intra como inter-molinos, el que debe ser optimizado.(55,58) A pesar de esto, se logró un aumento adicional en la ingesta de folatos, en un promedio de 427µg al día en la población objetivo (95% IC 409–445µg)(54), y un aumento cerca de cuatro veces las concentraciones folatos sanguíneo en mujeres de edad reproductiva llegando a un valores de $37,2 \pm 9,5$ nmol/L.(54) Esta intervención ha sido altamente costo-efectiva para Chile, determinando una importante reducción en la incidencia de defectos del tubo neural, de aproximadamente 30-40%.(19,21,59,60) Además existe evidencia de que otras malformaciones congénitas como malformaciones cardíacas, urológicas, y de extremidades pueden disminuir con la suplementación peri-concepcional con ácido fólico.(41)

Actualmente existen recomendaciones de consumo de suplementos nutricionales con ácido fólico para las mujeres que desean embarazarse, con el objeto de prevenir malformaciones congénitas. La evidencia existente es del tipo II-2-A, es decir que provienen de estudios de cohorte o casos y controles bien diseñados, de más de un grupo de investigación.(12) Tel comité genético y la sociedad de ginecología y obstetricia de Canadá recomienda a mujeres, sin factores de riesgo para gestar fetos con malformaciones congénitas, consumir dieta rica en folatos y suplementos vitamínicos con 400µg a 1mg. de ácido fólico diariamente, por lo menos por 3 meses pre-concepcionales hasta el término de la lactancia o al menos hasta las 4-6 semanas postparto.(9,12) Para paciente con factores de riesgo, como epilepsia, diabetes

dependiente de insulina, obesidad, antecedentes de defectos del tubo neural en embarazos previos y grupos étnicos de riesgo, se recomienda consumir dieta rica en folatos y suplementos vitamínicos con 5mg. de ácido fólico diariamente, por lo menos por 3 meses pre-concepcionales hasta las 12 semanas post-concepción y luego continuar con suplementos vitamínicos con 0.4 a 1mg. de ácido fólico diariamente hasta terminar la lactancia, o al menos 4-6 semanas postparto.(12)

En esta tesis plantea que la intervención con ácido fólico puede haber tenido efectos beneficiosos en la prevención de ocurrencia y recurrencia de las Fisuras Labio-palatinas, y se esperaba observar una respuesta similar a la que hubo con los defectos del tubo neural. Este planteamiento se basa en que ambas malformaciones presentan semejanzas embriológicas y epidemiológicas, lo que se describirá a continuación.

Fisuras Labio-palatinas y Defectos del Tubo Neural

Las fisuras labio-palatinas y los defectos del tubo neural, son defectos congénitos que presentan algunas semejanzas y, al mismo tiempo, diferencias en sus procesos embriológicos. Existen 2 teorías con respecto a la alteración del desarrollo de los segmentos cráneo-faciales. Una teoría plantea que se debe a la falta de cierre de estructuras embrionarias; la ausencia de fusión de las paredes epiteliales, conlleva una falta de fusión posterior de los tejidos mesenquimales.(44) La otra teoría plantea una falta de desarrollo de una unidad del embrión, llamada neurómero y de sus células de la cresta neural, que concomitantemente produce falta de desarrollo de algún campo de desarrollo cráneo-facial.(61) Las fisuras palatinas y los defectos del tubo neural son defectos que involucran la línea media del embrión. No así las fisuras de labio, que se encuentran laterales a la línea media.(62) Ambos defectos se producen durante el período embrionario, pero desfasados en algunas semanas de gestación.

Durante las primeras semanas de gestación el proceso fronto-nasal forma los orificios nasales, diferenciándose las prominencias nasales laterales y mediales. Luego los procesos maxilares avanzan hacia la línea media y se fusionan con las prominencias nasales mediales para formar el labio superior y el paladar primario, lo cual se produce cerca de las sexta a séptima semanas de gestación. La falta de fusión de estas prominencias generan la fisura de labio, que puede o no tener fisura de paladar primario y/o alvéolo, según la severidad. La formación del paladar comienza como un repliegue de los procesos maxilares. Estos repliegues se encuentran laterales a la lengua, en una

posición vertical, y forman los llamados pliegues palatinos. Luego, los pliegues palatinos se disponen en una posición horizontal, desplazando a la lengua hacia abajo y migran hacia la línea media, para luego fusionarse entre la octava y duodécima semana de gestación.(3) La fusión de los pliegues palatinos separa la cavidad nasal y la oral, y su falta de fusión produce la fisura de paladar.(28) En la formación del labio y paladar se incluyen complejos procesos celulares, como proliferación, diferenciación, y apoptosis, guiados por las células de la cresta neural y regulados por factores genéticos y ambientales, que conforman complejas rutas de señales celulares, y que, actualmente, en activa investigación.(44,63)

Por otra parte, los defectos del tubo neural -cuyas expresiones más frecuentes incluyen anencefalia, encefalocele, espina bífida, mielomeningocele, agenesia caudal, entre otros-, se producen por falta de cierre del neuroporo superior o inferior. El neuroporo superior e inferior se cierran durante la tercera y la cuarta semana después de la gestación, respectivamente(12). Por lo que, aproximadamente, podemos decir que el cierre del neuroporo y el cierre del paladar secundario se desarrollan con 50 días de separación, aproximadamente.(44) Teniendo presente que el ácido fólico tiene una vida media de 100 días en el cuerpo humano, es plausible que los defectos del tubo neural y las Fisuras Labio-palatinas, en presencia de déficit de ácido fólico, se expresen fenotípicamente en el mismo paciente. Encontrar ambas malformaciones en un recién nacido es extremadamente infrecuente (44,47), probablemente porque muchos de estos embarazos no llegan a término, dado el compromiso fetal de las malformaciones.

Las fisuras labio-palatinas y los defectos del tubo neural tienen factores asociados y características epidemiológicas parecidos. Presentan asociaciones con factores ambientales y genéticos semejantes, y ambos defectos tienen ausencia de factores genéticos mayores identificados.(30,64) Los factores ambientales que se plantean que se encuentran asociadas a ambos tipos de malformaciones son infecciones fetales, enfermedades maternas, deficiencia nutricional, consumo de drogas o sustancias, etc.(11,28) De los factores ambientales, los más destacados que afectan a ambos tipos de malformaciones son las deficiencias de vitaminas, como folatos, B6 y B12, siendo las tres vitaminas importantes en el ciclo de metilación del DNA.(44)

A pesar de tener elementos semejantes, la presencia simultánea de Fisura de Labio-paladar y defectos del tubo neural, es infrecuente y se presenta en casos de deficiencia severa de ácido fólico o en presencia de trisomía 13 o 18.(29,44)

La evidencia que asocia las Fisuras Labio-palatinas con el ácido fólico, es menos concluyente, que para el caso de los defectos del tubo neural. Lo que se conoce hasta la fecha, será sintetizado en el siguiente segmento.

Ácido Fólico en Multi-vitamínicos y Fisuras Labio-palatinas

Existe evidencia de que el consumo de multi-vitamínicos con ácido fólico disminuye la incidencia de afecciones perinatales, tales como defectos del tubo neural, malformaciones cardíacas, urinarias, fisuras labio-palatinas, defectos de extremidades y estenosis hipertrófica del píloro.(12)

En el caso de las fisuras labio-palatinas, existe evidencia recogida en algunos metanálisis que el consumo de multi-vitamínicos maternos que contengan ácido fólico es un factor protector para el desarrollo de Fisuras Labio-palatinas, logrando una disminución del riesgo.(8,13,63,64) Los metanálisis de Goh et al. y Johnson et al., sugieren que el uso de suplementos vitamínicos durante el embarazo, disminuye el riesgo de fisuras de labio con o sin paladar, con un OR de 0,63 (OR = 0,63, IC 95% 0,54;0,73) y un OR de 0,75 (OR = 0,75, IC 95% 0,65;0,88), respectivamente, pero el efecto para las fisuras de paladar, es menor, con un OR de 0,76 (IC 95% 0,62;0,93) y 0,88 (IC95% 0,76;1,01), respectivamente, aunque con un intervalo de confianza que no descarta el valor nulo en el metanálisis de Johnson et al.(14,65) Esta observación sugiere que la fisura de labio con o sin paladar es una entidad fisiopatológica diferente a la fisura de paladar, pero que ambas comparten algunos factores de riesgo.(14) Podemos decir que plantea que los multi-vitamínicos con ácido fólico disminuyen el riesgo de fisuras de labio con o sin paladar, pero la evidencia en el caso de las fisuras de paladar, aún no es concluyente.

Aún existe discrepancia en la evidencia del rol protector del ácido fólico aislado, no administrado con otras vitaminas y micronutrientes, en la prevención de Fisuras Labio-palatinas. Revisaremos con mayor detalle, cuáles han sido los estudios sobre ácido fólico y fisuras labio-palatinas, como suplemento o a través de la fortificación de alimentos.

Ácido Fólico, Fortificación y Fisuras labio-palatinas

Se ha postulado que el déficit de ácido fólico participa en los mecanismos causales del desarrollo de fisuras faciales. En la literatura existe controversia en el rol preventivo del ácido fólico para la disminución de la ocurrencia y recurrencia en la fisura de labio-palatina.(17,29) Existen muchos trabajos que apoyan la existencia de un efecto

protector de la ingesta de ácido fólico en la reducción de incidencia de Fisuras Labio-palatinas.(5,14,16–18) y otros no encuentran disminución alguna.(9,13,19–21) Buscando la acción del ácido fólico, un meta-análisis que incluye estudios observacionales, identifica un efecto atenuador del riesgo de aparición de fisura de labio con o sin paladar, con un OR de 0,82 (OR = 0,82, IC 95% 0,7; 0,97) y de aparición de fisura de paladar, con un OR de 0,95 (OR = 0,95, IC 95% 0,79-1,14). Ambos estimadores son muy cercanos o incluyen el valor de nulidad, por lo que, los autores concluyen que no existe suficiente evidencia que el ácido fólico aislado disminuya el riesgo de fisuras labio-palatinas.(14,23) No existen estudios aleatorizados de calidad, que evalúen la ingesta de ácido fólico sin otras vitaminas, para obtener conclusiones.

La fortificación de la harina u otros alimentos de consumo habitual de la población, se ha planteado como medida efectiva para aumentar aporte de ácido fólico, enfocados en aumentar el aporte a las mujeres en edad fértil, y así lograr una disminución de defectos congénitos, en especial de los defectos del tubo neural. Algunos países, como Inglaterra, en vez de usar la fortificación de alimentos, se plantearon el objetivo de aumentar el consumo suplementos vitamínicos que contengan ácido fólico, durante en el periodo peri-concepcional y no han implementado la fortificación de alimentos, dado la incertidumbre de los efectos adversos a nivel poblacional.(17)

Las madres jóvenes, con bajo nivel de educación, bajos ingresos y bajo nivel socio-económico tienen mayor riesgo de consumir ácido fólico periconcepcional bajo los niveles recomendados.(5) El déficit ácido fólico pudiese ser el factor que explica la asociación entre nivel socio-económico bajo y la mayor presencia de recién nacidos con Fisuras Labio-palatinas,(30,31) pero más estudios se requieren para confirmar esta hipótesis. Otras variables confusoras pudiesen ser el consumo de tabaco, alcohol, exposición a teratógenos u otros déficit nutricionales.(33)

La mayoría de los embarazos, en Chile y otros países en vías de desarrollo, son no planificados.(67) Los cambios hacia conductas saludables y de mayor autocuidado periembarazo son marginales.(68) Entusiasmar, a través de campañas publicitarias, a las mujeres en edad fértil a consumir 400µg de ácido fólico diario adicional, han sido infructíferos, para lograr el aumento del consumo de ácido fólico y una disminución de la incidencia de defectos del tubo neural, en países que no han incorporado la fortificación

de alimentos con ácido fólico.(10,48) Por otras parte, es fundamental la suplementación durante las primeras semanas de gestación, incluso durante el periodo que la madre no sabe que está embarazada. Por estos motivos, y porque las mujeres más vulnerables son las que justamente tienen menor hábito de consumo de ácido fólico como suplemento, la recomendación de consumo de ácido fólico pre-concepcional en forma individual, sería inoperante para la mayor parte de las mujeres en Chile.(8) Es así como, el programa de fortificación de la harina con ácido fólico permite entregar niveles de aporte semejante a toda la población objetivo y disminuir las disparidades.(29,48)

La fortificación de granos de cereal en Canadá, implementada durante el año 1998, no observó una disminución de en la prevalencia de las fisuras oro-faciales, en el periodo post-fortificación,(13) a diferencia de la fortificación en Estados Unidos, donde se identificó una disminución de 6% incidencia de fisuras oro-faciales.(16) En el Estado de Paraná, Brasil, la fortificación en la harina con ácido fólico disminuyó en un 18.52% los casos incidentes de Fisuras Labio-palatinas no sindromáticas (OR = 0.81, CI 0.72-0.93, $p = 0.002$). (23) Canfield et al. reportan en el año 2005 una reducción significativa de 12% en la fisuras de paladar en 23 estados de los Estados Unidos, pero no de las fisuras que comprometen el labio con o sin paladar.(18)

Los estudios de Nazer et al. en Chile encontraron una disminución significativa de los defectos del tubo neural, luego de la fortificación de la harina con ácido fólico, pero no así de otras malformaciones congénitas, incluidas las Fisuras Labio-palatinas.(8,14,21,32) Estos trabajos están basados en 14 maternidades del país, las cuales forman parte del ECLAMC (acrónimo para estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas), incluyéndose la maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, que tiene el objetivo llevar un registro de malformaciones congénitas a nivel local. No existen estudios que evalúen el efecto de la fortificación de la harina con ácido fólico en la incidencia de las Fisuras Labio-palatinas con datos de registro a nivel nacional.

A pesar de que hay evidencia que apoya la existencia de un factor protector del ácido fólico sobre la formación de fisuras labio-palatinas, la incertidumbre persiste. Estos estudios observacionales pueden estar sesgados, especialmente porque las madres embarazadas pueden tener otro tipo de autocuidados maternos, como consumo de vitaminas o comportamientos nutricionales saludables, evitar consumo de alcohol y

tabaco, etc, no evaluados como confusores, y que pueden disminuir el riesgo de Fisuras Labio-palatinas.(13,24,27)

Relación Dosis-Efecto de Ácido Fólico y Recurrencia de Fisura Labio-palatinas:

Existen resultados discrepantes con respecto a la dosis de ácido fólico incluidos en los multi-vitamínicos que previene la recurrencia de las Fisuras Labio-palatinas, y si tiene mayor efecto en prevenir todo tipo de fisuras, o alguno en específico.(30)

La recurrencia está definida como la ocurrencia de Fisura Labio-palatina en un recién nacido, cuando la madre tiene el antecedente de haber nacido con fisura o haber tenido otro hijo con Fisura Labio-palatina, previamente. El riesgo de recurrencia, en el caso de Fisuras Labio-palatina no sindromáticas aumenta considerablemente, en comparación a la población sin esos antecedentes (4–5% versus 1/1.000).(27) En el caso de fisuras sindromáticas, el riesgo de recurrencia está determinado por el patrón de herencia de los genes comprometidos.(3) Para las Fisuras Labio-palatinas no sindromáticas, cuando existe el antecedente de fisura de labio con o sin paladar, la recurrencia estimada es de 4% y en caso de tener un antecedente de fisura de paladar, la recurrencia está estimada en 2%.(3,27) Se ha planteado que para evitar la recurrencia de las Fisuras Labio-palatinas, se necesitan dosis más altas de ácido fólico, semejante a las recomendadas para prevención de la recurrencia de los defectos del tubo neural.(27,48,69) Los estudios que evalúan recurrencia de Fisuras Labio-palatinas, presentan variación en la dosis administrada de ácido fólico (0.5–10mg) incluidos en los multi-vitamínicos. A pesar de encontrar disminución de la recurrencia,(24) no se encontró diferencias en los efectos, lo cual sugiere que no existe un efecto dosis-respuesta en la prevención de la recurrencia de las Fisuras Labio-palatinas.(14) Wehby et al., realizaron un estudio aleatorizado, doble ciego, con dos grupos de mujeres con antecedentes previos de fisura labio-palatinas quienes tomaron 4mg o 0.4mg de ácido fólico, sin encontrar diferencias en la recurrencia en ambos grupos.(27)

Es aún discutido cuál es el real efecto del ácido fólico. En algunos trabajos, es difícil evaluar el efecto independiente del consumo de ácido fólico cuando es administrado en conjunto con otras vitaminas.(27) Por otra parte, sería anti-ético realizar un estudio controlado aleatorizado sobre Fisuras Labio-palatinas comparando ácido

fólico y placebo, dado el efecto beneficioso en la disminución de la incidencia de los defectos del tubo neural.(33) Pero, se hace fundamental la realización de más estudios controlados aleatorios que exploren los eventuales beneficios de altas y bajas dosis de ácido fólico en la prevención de recurrencia y ocurrencia de fisuras labio-palatinas.(26,29,52,69)

A pesar de que no se ha comprobado efectos dañinos para el feto o la madre,(12) todavía no está descartada la posibilidad de efectos adversos de la fortificación de ácido fólico en los alimentos para el resto de la población general.

Eventuales Efectos de Adversos del Ácido Fólico y de la Fortificación

El riesgo de toxicidad por ingesta de ácido fólico es baja.(12) Los niveles plasmáticos no metabolizados de la vitamina son excretado por la orina, dado que tiene características hidrosolubles.(12) Cuando se sobrepasa la ingesta máxima tolerable, se encuentran valores plasmáticos de ácido fólico no metabolizados. La ingesta diaria de ácido fólico que se acerca de la ingesta máxima tolerable es de 600 µg al día en niños y 1.000 µg al día en adultos.(48,57) Un estudio chileno evaluó cuales grupos etarios presentaban ingestas de ácido fólico excesivas después de la fortificación de la harina con ácido fólico implementado en el año 2000, encontrando que los niños menores de 13 años de edad, con menor nivel socio-económico, presentar ingesta excesivas de ácido fólico, a través del pan, y podrían estar en riesgo.(57) De las mujeres chilenas en edad fértil sólo, aproximadamente un 3%, consumen más de 1.000µg al día de ácido fólico (ingesta máxima tolerable para adultos).(54) A pesar de que el ácido fólico presenta una baja toxicidad, existe preocupación por los efectos desconocidos que puede tener en el desarrollo de cánceres y para otras patologías, las cuales se discutirán a continuación.(12,13)

Dado que el ácido fólico actúa como cofactor en el crecimiento y proliferación celular, el aumento en el consumo de ácido fólico, se ha planteado que pudiese aumentar la incidencia de diferentes tipos de cánceres.(12,13) De los cánceres que más han generado preocupación son el cáncer de colon, mama y próstata.(48) Un metanálisis reciente del 2012 en EEUU no encontró asociación entre la incidencia de cáncer de colon, próstata, pulmón y mama, ni otro sitio específico de cáncer, con la suplementación con ácido fólico.(71) Otros autores describen un efecto beneficioso, y no perjudicial, en el cáncer, como es el caso de un estudio que plantea un efecto

atenuador del riesgo de cáncer de colon en pacientes con altos niveles de consumo de alcohol.(72) Las últimas revisiones concluyen que existe insuficiente evidencia que afirme que existe una asociación entre el riesgo de cáncer y el aumento del consumo de ácido fólico, pero tampoco se descarta una asociación.(48)

Otro de los temores en la implementación de la fortificación con ácido fólico, es el efecto que puede tener las altas dosis de ácido fólico, en personas que no constituye la población objetivo, como por ejemplo, los adultos mayores. Los pacientes mayores de 50 años están en mayor riesgo de presentar deficiencia de vitamina B12 y se ha planteado que la suplementación del ácido fólico puede enmascarar la anemia perniciosa, la cual se produce por déficit de vitamina B12, y que se ve asociada a daño neurológico y neuropatías periféricas en el caso que no se diagnostique, ni se trate.(48,52) Estudios recientes han concluido que suplementación con ácido fólico, no enmascara el déficit de vitamina B12, es decir, los eritrocitos siguen presentando macrocitosis, elemento característico de la anemia perniciosa, a pesar de la suplementación con ácido fólico, y que no se requiere estudios de laboratorio, previo al inicio de la suplementación (evidencia tipo II-2-A).(12,48)

Conocer los beneficios y riesgos de una política pública como la suplementación con ácido fólico en los alimentos, refleja una responsabilidad ética sobre las decisiones que se deben tomar por el colectivo.

Justificación de la Realización de esta Tesis y Aspectos Éticos Relevantes.

A diferencia de la ética médica, la ética en la salud pública tiene consideraciones particulares. Entre las características propias de las intervenciones en salud pública se destaca que el bien buscado es un bien público o colectivo; tiene un enfoque especial hacia la prevención; y generalmente necesita una acción a través de políticas públicas.(73) Uno de los puntos más interesantes es que las intervenciones en salud pública se encuentran en conflicto entre los bienes colectivos y el principio de autonomía individual. Por otra parte, considera el concepto de justicia social, que incluye el concepto de la distribución justa de los beneficios y cargas de las intervenciones.(73) En este contexto, se hace fundamental evaluar los efectos beneficiosos y perjudiciales de las políticas públicas y, en este caso, de la fortificación de la harina con ácido fólico en Chile.

Por otra parte, la existencia de una fuerte discusión en la literatura sobre la

asociación del ácido fólico y las Fisuras Labio-palatinas, y la imposibilidad de realizar estudios experimentales para evaluar la incidencia de Fisuras Labio-palatinas, que compare ingesta de placebo con la ingesta de ácido fólico, dado los beneficios comprobados contra los defectos del tubo neural, nos plantea la necesidad de realizar estudios observacionales que permitan evaluar los efectos de ácido fólico. Nazer et al. evaluó la incidencia de 22 malformaciones congénitas antes y después de la fortificación de la harina con ácido fólico en un conjunto de maternidades de nuestro país, las cuales participan en el Estudio Colaborativo en Latinoamérica de Malformaciones Congénitas (ECLAMC), sin encontrar cambio en la tasa de incidencia de fisuras labio-palatinas.(74) El sesgo que pudiese presentar este estudio es que las maternidades que participan del ECLAMC no reflejen a cabalidad a la población nacional, como por ejemplo, el hecho que sean centros de derivación de patologías complejas, como es el caso de defectos congénitos que necesitan atención neonatal de alta complejidad, haría que la tasa de incidencia se mantenga elevada. Este es la hipótesis que plantea el mismo Nazer et al. en otro artículo que discute las causas del aumento de la incidencia de las fisuras de labio con y sin paladar en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile en el período 2000 a 2008.(32) No existen estudios que evalúen los efectos de la fortificación de la harina con ácido fólico, en la incidencia de Fisuras Labio-palatinas con datos de registro a nivel nacional, lo cual permitiría ser un aporte más en la discusión de la asociación entre el ácido fólico y las Fisuras Labio-palatinas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

Con posterioridad a la implementación del programa de fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile ¿hubo un efecto observable a nivel poblacional sobre la incidencia de las Fisuras Labio-Palatinas?.

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Explorar la tendencia de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y evaluar si existe un cambio en la tendencia en el período post-fortificación.

Objetivos Específicos:

- 1.- Calcular tasa de egresos hospitalarios -como “proxy” de la incidencia- de Fisuras Labio-palatinas en menores de 1 año de edad durante el periodo 1986 y 2012.
- 2.- Explorar la tendencia de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas, y determinar si hubo una caída de la tasa, concomitante con la caída de la tasa de incidencia de los defectos del tubo neural, posterior al año 2000.
- 3.- Describir la tendencia de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas divididas según diagnóstico en: fisura de labio, fisura de paladar, y fisuras labio con o sin paladar.
- 4.- Explorar si otras variables poblacionales que variaron en el período en el país se asocian con la variable tasa de egreso hospitalario de Fisura Labio-palatina. Se incluyeron en esta categoría tasa de incidencia de rubeola en la población, porcentaje de indigencia en Chile, porcentaje de pobreza en Chile, prevalencia de consumo de alcohol en mujeres en el último mes, prevalencia de consumo de tabaco en mujeres en el último mes, y prevalencia de obesidad en embarazadas.

HIPÓTESIS:

La fortificación de la harina con ácido fólico en Chile, produjo una disminución, en la incidencia de las Fisuras Labio-palatinas al comparar los períodos pre y post fortificación, lo cual se debería reflejar en una disminución de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas.

MÉTODOS

Estudio ecológico, tipo serie de tiempo, esencialmente descriptivo, -de carácter exploratorio en su dimensión analítica- de la población de menores de 1 año entre 1986 a 2012 en Chile, obteniéndose la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas como un valor aproximado a incidencia de Fisuras Labio-palatinas, con los códigos CIE-10 siguientes: fisuras de paladar Q.35.0 a Q.35.9; fisuras de labio Q.36.0 a Q.36.9 y fisuras de labio-paladar Q.37.0 a Q.37.9.

Variables y su Operacionalización:

Indicadores de la incidencia de Fisuras Labio-palatinas:(6)

Dado que no existen registros de incidencia de malformaciones congénitas a nivel nacional, parece adecuado acercarse a este problema a través de egresos hospitalarios, teniendo presente que existen algunas diferencias. Los pacientes fisurados pueden tener más de un egreso hospitalario durante su primer año de vida, como por ejemplo el egreso del servicio de neonatología y los egresos quirúrgicos de cierre de labio a los 3-6 meses de edad y cierre del paladar, generalmente entre los 12-24 meses.(6) Cabe destacar que el momento de la cirugía de estos pacientes se ha mantenido estable en el tiempo, por lo que a pesar de que las Fisuras Labio-palatinas puedan tener más de un egreso hospitalario en el año de vida, esta conducta se mantiene semejante en todo el período. Por ello, la eventual repetición de casos no invalida el análisis de la tendencia y la búsqueda de diferencias temporales de la tasa de egresos hospitalarios producto a algún elemento externo en este período de tiempo.

Consecuentemente se propuso estudiar el problema señalado a partir de las siguientes variables:

1. **Tasa de egresos hospitalarios por Fisuras labio-palatinas.** La tasa de egresos hospitalarios permite acercarnos a la probabilidad matemática de ocurrencia de nacimiento de un niño con Fisura Labio-palatina en los recién nacidos (rn) del país, en un tiempo definido.

Tasa de egresos hospitalarios de Fisura, Año X:

= Egresos hospitalarios con o sin repetición de identificación x 1000

Recién Nacidos Vivos Corregidos (rn) de Año X

Se analizó en esta forma los egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas en total y por diagnóstico (fisura de labio Q.36.0 a Q.36.9, fisura de paladar Q.35.0 a Q.35.9, y fisuras labio-paladar Q.37.0 a Q.37.9). Se generó la categoría fisura de labio con o sin paladar, ampliamente usada en la literatura, con la suma de los egresos hospitalarios de fisuras de labio más las fisuras de labio y paladar (Q.36.0-Q36.9 + Q.37.0-Q37.9). Además se analizaron estas tasa con y sin repetición de número identificador, en el caso que se tenga ese dato.

2. **Tiempo y período pre y post fortificación.** Variable numérica continua (período desde 1986 al 2012), categorizado en forma anual, agrupada pre-fortificación (1986-2000) y post-fortificación (2001-2012) y por quinquenios (1986-1990, 1991-1995, 1996-2000, 2001-2005, 2006-2010, 2011-2012). Al usar la categorización pre y post fortificación, representa la variable exposición, siendo esta la variable subrogante a la intervención, es decir, representa el año en que se implementó de la fortificación con ácido fólico en la harina de trigo en Chile.
3. **Otras variables:** En esta categoría consideramos otras variables con registro poblacional que han sido relacionadas con las Fisuras Labio-palatinas y que pudieron haber experimentado variaciones en el período, actuando en algunos casos como variables de confusión, como son:

a.- Porcentaje de pobreza e indigencia anual en Chile:(75) los datos fueron obtenidos del informe de la encuesta Casen 2013, usando la medición de pobreza y pobreza extrema o indigencia con la metodología tradicional. Esta encuesta, evalúa las características socioeconómicas a nivel nacional, realizada por el Ministerio de Desarrollo Social del Gobierno de Chile. En particular, para el análisis de pobreza e indigencia a nivel nacional existe un margen de error de los datos menor a 1% para la variable pobreza y menor a 0,5% para pobreza extrema durante los años 1996-2011, lo cual entrega bastante precisión para este análisis.(76)

b.- Prevalencia del consumo de alcohol y tabaco en mujeres en el último mes:(77) Los datos fueron obtenidos de encuesta de los estudios nacionales de drogas en la población general, los cuales se han realizado cada 2 años desde 1995 hasta la fecha. Esta encuesta posee una muestra representativa a nivel regional y nacional, en base a una selección aleatoria de manzanas y viviendas y con una tasa de logro mayor al 80%.(78)

c.- Incidencia de rubeola en la población:(79) Desde 1956 existe registro de enfermedades de notificación obligatoria, entre las cuales se encuentra la rubeola. La Tasa de incidencia de rubeola en la población por 100.000 habitantes están a libre disposición en el DEIS, Departamento de Estadística e Información de Salud en su pagina web.(80) Este es un registro presenta una estricta normativa de notificación, vigilancia y penalización en el caso que esta no se cumpla.(81,82)

d.- Prevalencia de obesidad en embarazadas: (83,84) Estos datos fueron obtenidos del Minsal, DEIS. Este registro se basa en encuestas, principalmente, pero están metodológicamente realizadas para logran una muestra representativa a nivel país y así lograr adecuada precisión.

Recolección y revisión e imputación de datos

La recolección de Datos se realizó a través de la revisión de egresos hospitalarios en www.deis.cl (DEIS-MINSAL, Departamento de estadística e información de salud) y revisión de la Biblioteca del Ministerio de Salud. La búsqueda constó de identificar de egresos los hospitalarios con código CIE-10 correspondientes a Fisuras Labio-palatinas (fisuras de paladar Q.35.0 a Q.35.9; fisuras de labio Q.36.0 a Q.36.9 y fisuras de labio-paladar Q.37.0 a Q.37.9) de menores de 1 año en el período 1986-2012. Además se solicitaron los datos sin repetición de pacientes al DEIS, sin poder identificarlos individualmente dado no entregaron rut o numero identificador, sólo los egresos hospitalarios totales de ese año con esos diagnósticos CIE-10.

Se estructuró para este efecto una base de datos con tasa de egresos hospitalarios calculada anualmente, la variable subrogante de intervención con ácido fólico, porcentaje de pobreza e indigencia anual, prevalencia de consumo de alcohol y tabaco en mujeres en el último mes, incidencia anual de rubeóla en la población, y prevalencia anual de obesidad en embarazadas. En el caso de tener datos incompletos, se realizó un análisis con datos imputaron los datos faltantes, usando los criterios de imputación univariado con regresión lineal.

Análisis Estadístico:

En el Departamento de Estadística e Información en Salud (DEIS), se obtuvo los registros de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas desde 1986 hasta 1993; luego se interrumpe la serie, con sólo un año disponible (1996) y se reinicia en forma consistente a partir de 2001, contándose con datos hasta 2012. En el período entre 1986 a 1996 los datos encontrados corresponden a los egresos hospitalarios agrupados, sin diferenciación entre fisuras de paladar, labio o labio y paladar. Para el período entre 2001 al 2011, los datos por diagnóstico se encontraron separados por diagnóstico de fisuras de labio, fisuras de paladar, y fisuras de labio y paladar, en forma separada. Para el período 2004 a 2011, el DEIS cuenta con el registro de egresos hospitalario por diagnóstico del tipo de Fisura Labio-palatina y con número de identificación, lo que permitió obtener egresos hospitalarios no repetidos para ese mismo paciente durante su primer año de vida.

Para el análisis de estos datos se procedió en las siguientes etapas:

- 1.- Descripción de la tendencia de la tasa de egresos hospitalarios anual para Fisuras Labio-palatinas como grupo total anual y agrupada en quinquenios mediante gráficos simples de tendencia.
- 2.- Comparación de la frecuencia de egresos hospitalarios de menores de 1 año con fisura labio-palatina entre los años pre-fortificación y los años post-fortificación, calculando el odds ratio.
- 4.- Identificación de puntos de quiebre en la tendencia de la curva de tasas de egresos hospitalarios de las Fisuras Labio-palatinas, a través de Modelo MARS (Multivariate Adaptive Regression Splines), en el programa "R".
- 5.- Describir y graficar las tendencias de las curvas de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas por diagnóstico de fisuras (fisura labio, fisura de paladar, fisura labio y paladar, y fisuras labio con o sin paladar).
- 6.- Análisis descriptivo y gráfico de tendencia de las eventuales variables explicatorias elegidas.
- 7.- Modelamiento del efecto de cada variable y el conjunto en la tendencia de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas en el período en Chile. Se analizó la asociación temporal de la tasa de egresos hospitalarios de las Fisuras Labio-palatinas, la variable

subrogante de la fortificación de la harina con ácido fólico y otras variables, con Modelos de Prais-Winsten y Modelos Mixtos. Además de la variable subrogante de intervención con ácido fólico, las variables incluidas en este análisis son: porcentaje de pobreza e indigencia anual, prevalencia de consumo de alcohol y tabaco en mujeres en el último mes, incidencia de rubeóla en la población, y prevalencia de obesidad en embarazadas. En el caso de tener datos incompletos, se realizó un análisis con datos imputados los datos faltantes, usando los criterios de imputación univariado con regresión lineal. Se corrigió los datos egresos hospitalarios totales del año 2008, disminuyendo los datos repetidos sólo a un 8,5% más de los datos sin repetición de número identificador. Además se realiza análisis de estas variables con los datos colapsados, es decir, calcular los promedios con desviación estándar de estas variables imputadas por cada período quinquenal (1986-1990, 1991-1995, 1996-2000, 2001-2005, 2006-2010, 2011-2012).

Excepto cuando indicado, todos los análisis se realizaron con el software STATA 11.2(85).

Marco de referencia de los Modelos Estadísticos Utilizados:

1.- Modelos MARS (multivariate Adaptive Regression Splines):

Para detectar tendencias significativas de cambio en la tasa de egresos hospitalarios que pudiesen existir en el período, se usó Modelos MARS en programa "R"(86), donde la tasa de egresos hospitalarios fue la variable respuesta y las variable predictora fue el tiempo expresado en años. Estos modelos, de la familia de modelos lineales generalizados, permiten identificar relaciones no lineales entre la variable dependiente y las variables predictoras o explicatorias, usando una función de suavizamiento no paramétrica(87). En general el modelo tiene la estructura siguiente:

$$Y = \alpha + \sum_{j=1}^n f_j(X_j) + \xi$$

Donde:

α = el intercepto

Y = Variable dependiente

Xj = son las variables explicatorias.

fj(Xj) = función de suavizamiento

La función fj(Xj) es estimada por un procedimiento de suavizamiento que se lleva a cabo en un primer paso como suavizamiento de los “splines”. Los “splines” son funciones polinómicas a trozos de la tendencia sobre las que se imponen restricciones en los puntos de unión llamados nodos.(88) La identificación de nodos permitió identificar quiebres en la tendencia de la curva de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas.

2.- Modelo de Prais-Winsten

El modelo de regresión lineal generalizado de Prais-Winsten se usó para calcular el promedio del cambio anual de la tasa de egresos hospitalarios, con su intervalo de confianza de 95%, evitando el efecto posible de autocorrelaciones, en el análisis de serie de tiempo. En este modelo la variable respuesta es dependiente del tiempo, los errores están correlacionados y se asume que siguen un proceso autocorrelativo de primer orden. En el caso univariado, como por ejemplo con la variable pre y post fortificación, como subrogante a la variable intervención, el modelo se especifica del modo siguiente:

$$Y_t = \beta_0 + \beta_1 x_t + u_t$$

Siendo:

Y_t = Serie de Tiempo de la Variable respuesta (Tasa de egresos de Fisura Labio-palatina)

β_0 = Parámetro fijo, intercepto del período completo.

β_1 = Parámetro fijo, coeficiente de regresión de la variable explicatoria, ejemplo pre y post-fortificación.

u_t = los errores siguen un proceso autorregresivo: $u_t = \rho u_{t-1} + e_t$

y los errores e_t son independientes e idénticamente distribuidos $N(0, \sigma^2)$.

3.- Modelos Mixtos o Multinivel:

Esta metodología es de especial interés cuando existen datos jerarquizados, es decir, las observaciones están anidadas en niveles jerárquicos: por ejemplo, nivel individual o de grupo; o bien, observaciones anidadas en el tiempo. Este modelos permitió analizar la influencia de varias variables de distinto nivel sobre una variable respuesta, así como corregir la autocorrelación entre niveles temporales. Los modelos mixtos utilizan el análisis de varianza por un factor de efectos aleatorios, donde el coeficiente de regresión de un nivel quinquenal es considerado aleatorio en el nivel temporal mayor.(89) La significación estadística se observa con la prueba de Wald Z, entregando como resultado un coeficiente de correlación intraclase (CCI).

En este caso hemos considerado un modelo con dos niveles, período completo y por quinquenios, con intercepto aleatorio dejando la pendiente fija. De esta forma, el modelo quedaría definido como:

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{ij} + u_{0j} + e_{0ij}$$

Donde:

y_{ij} = Variable respuesta (Tasa de egresos de Fisura Labio-palatina), medida en la i-ésima unidad del nivel quinquenal anidada en la j-ésima unidad del período completo.

β_0 = Parámetro fijo, intercepto del período completo

β_1 = Parámetro fijo, coeficiente de regresión del regresor x en el quinquenio

u_{0j} = Variable explicatoria con parámetros $E(u_{0j}) = 0$ y $Var(u_{0j}) = \sigma_{u0}^2$

u_{1j} = Variable explicatoria con parámetros $E(u_{1j}) = 0$ y $Var(u_{1j}) = \sigma_{u1}^2$ además consideramos $cov(u_{0j}, u_{1j}) = \sigma_{u01}^2$

Las variables explicatorias se analizaron buscando asociación temporal e interacciones con la tasa de egresos de Fisuras Labio-palatinas en forma uni y multivariada, considerando su efecto conjunto con variable de exposición, la intervención con ácido fólico.

ASPECTOS ÉTICOS:

Dado que este trabajo es un estudio ecológico, se mantiene la privacidad y confidencialidad de los pacientes y de su diagnóstico, sin lograr la identificación de los casos.

Declaro no tener conflicto de interés.

Dado el conflicto entre los bienes colectivos y principio de autonomía individual, que presenta las intervenciones comunitarias y las políticas públicas en salud, se hace imperioso evaluar los eventuales efectos de éstas, ya sean positivas o negativas. En este caso, el evaluar eventuales beneficios de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico, en una patología que no se planteó como objetivo primario de la intervención; las Fisuras Labio-palatinas.

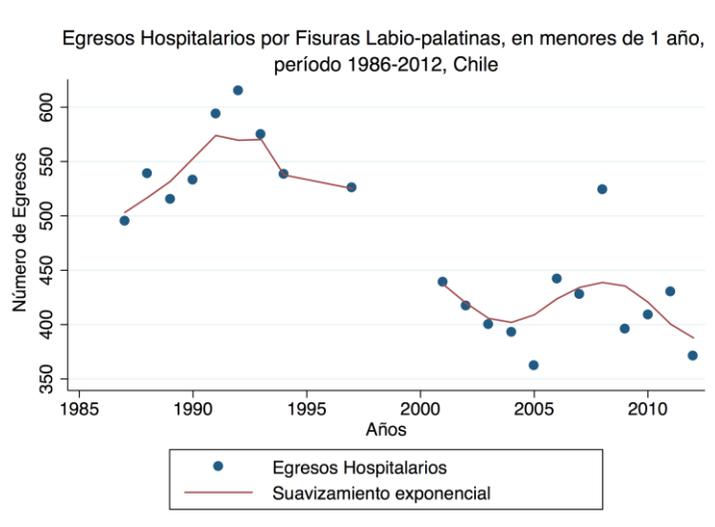
RESULTADOS:

Análisis de los Egresos Hospitalarios: 1986-2012

Para los años 1994-1995 y 1997-2000, no fue posible encontrar los registros de egresos hospitalarios en menores de 1 año para Fisuras Labio-palatinas ni en el DEIS, INE, o biblioteca del ministerio de salud. Con los datos de los años restantes se logra crear la curva de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas en la Figura 1.

En promedio existen 472 egresos hospitalarios anuales (DE \pm 75,3 egresos hospitalarios) en el período 1986-2012. Se observa una tendencia a la disminución de los egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas, siendo el promedio de egresos hospitalarios anuales de 538 (DE \pm 47,4) en el período 1986-1996, significativamente mayor, a 417 (DE \pm 41,9) egresos hospitalarios encontrados en el período 2001-2011 (t test $p < 0.001$). Ver Figura 1.

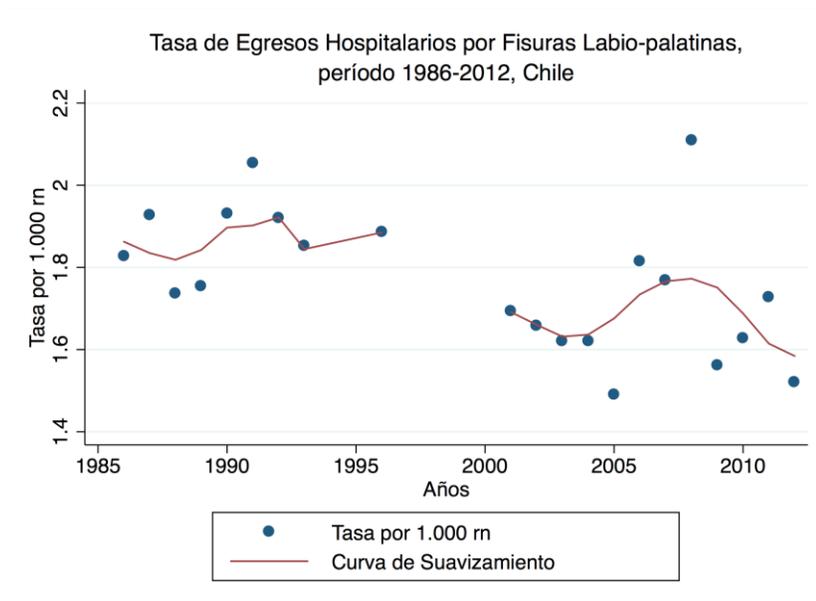
Figura 1: Egresos Hospitalarios en menores de 1 año con Fisuras Labio-palatinas, período 1986-2012, en Chile, con suavizamiento exponencial.



La tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas en menores de 1 año de edad, durante los años encontrados, se observan en la Tabla 1 y Figura 2. El análisis estadístico mostró que existían una mayor tasa de egresos hospitalarios por Fisura Labio-palatina, en menores de 1 año de edad, en el período 1986-1996, con un promedio de 1,87 por 1.000 rn (DE \pm 0,09), que en el período 2001-2012, con un promedio de 1,68 por 1.000 rn (DE \pm 0,16). Esto entrega un odds ratio de 1,09 (IC 95%

1,05-1,14, $p < 0,001$), es decir, existe una disminución de 9% de los egresos hospitalarios por esta patología al comparar ambos períodos. Ver Figura 2.

Figura 2: Gráfico de Tasa de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año con Fisuras Labio-palatinas, período 1986-2012, en Chile, con suavizamiento exponencial.



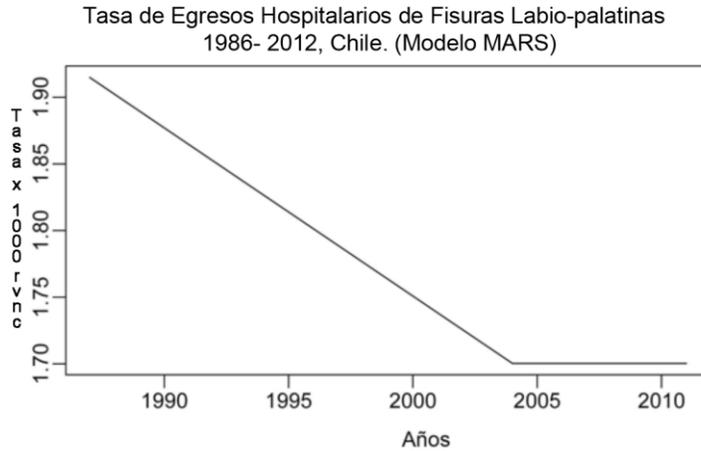
La disminución de la tasa en el período 2001-2012, se observó a pesar de la incorporación de las Fisuras Labio-palatinas en el programa de Garantías Explícitas de Salud (GES) en 2007, lo cual produjo un aumento de los egresos hospitalarios durante el 2008, no visto en los años previos. Nótese que en la Tabla 1 y Figuras 1, 2, 3 y 4, no hay corrección del año 2008, descrita en métodos.

Se esperaba identificar dos mesetas (una más elevada y la segunda en un nivel más bajo), y dos puntos de quiebre en las inflexiones de la curva de unión de ambas mesetas. Sin embargo, utilizando modelos MARS, no fue posible observar la primera meseta, detectándose sólo un descenso desde el año 1986 hasta el año 2002, para luego observar una meseta después del 2003 hasta el 2012 (Figura 3).

Tabla 1: Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas 1986-2012, Chile

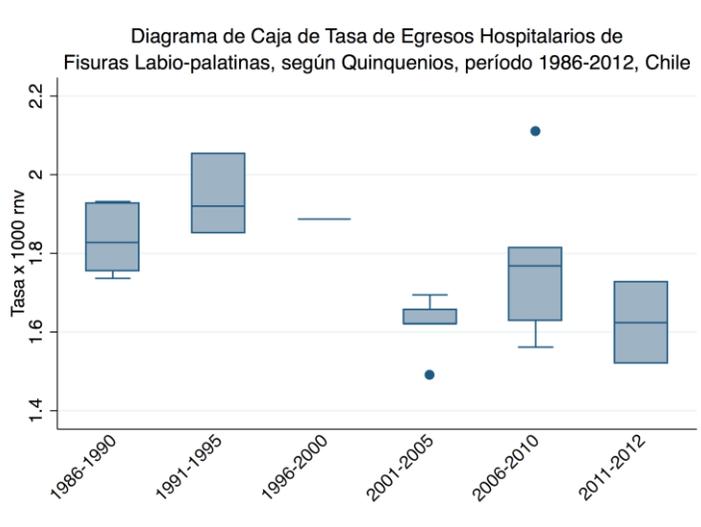
Año	Egresos Hospitalarios (EH)	Recién Nacidos Vivos Corregidos (rn)	Tasa EH x 1000 rn
1986	495	270870	1,83
1987	539	279762	1,93
1988	515	296581	1,74
1989	533	303798	1,75
1990	594	307522	1,93
1991	615	299456	2,05
1992	575	299456	1,92
1993	538	290438	1,85
1996	526	278729	1,89
2001	439	259069	1,69
2002	417	251559	1,66
2003	400	246827	1,62
2004	393	242476	1,62
2005	362	242980	1,49
2006	442	243561	1,81
2007	428	242054	1,77
2008	524	248366	2,11
2009	396	253584	1,56
2010	409	251194	1,63
2011	430	248879	1,72
2012	371	243858	1,52

Figura 3: Modelo de puntos de quiebre de la Tasa de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año con Fisuras Labio-palatinas, período 1986-2012, en Chile.



En la Figura 4 existe distribución de la tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas, agrupadas por quinquenios, en la cual se observó que los promedios quinquenales de las tasas en el período pre-fortificación de la harina con ácido fólico se encuentran por sobre una tasa de 1,8 por 1000 rnv y en el período post-fortificación se encuentran por debajo de estos valores.

Figura 4: Diagrama de Caja de Tasa de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año con Fisuras Labio-palatinas, según quinquenios, período 1986-2012, en Chile.



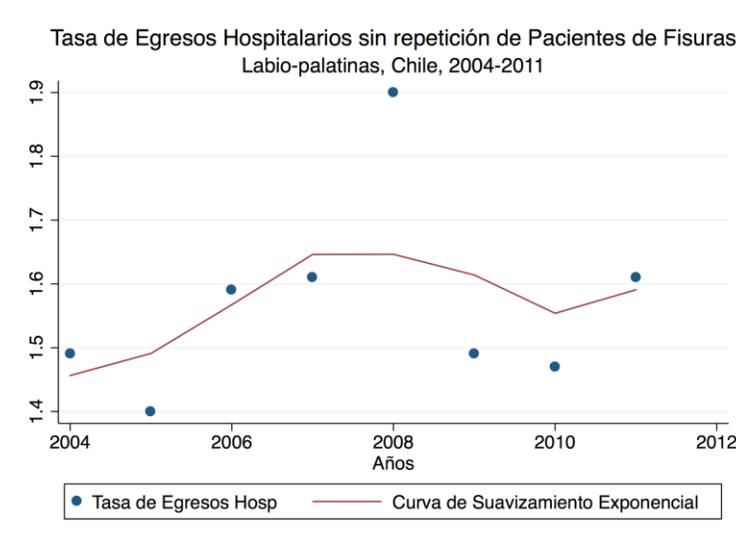
Análisis del Período 2004-2011:

Durante este período se obtuvo los datos de dos registros. Por una parte, se logró determinar un egreso hospitalario por cada paciente y por tipo de Fisura Labio-palatina durante los años 2004-2011, dado que el DEIS poseía los números de identificación de los pacientes y por otra parte, se obtuvieron los egresos hospitalarios totales y por tipo de Fisura Labio-palatina, pero sin identificación por RUT o número identificador, es decir, pudiendo tener pacientes con más de un egreso hospitalario durante su primer año de vida. En la Tabla 2 y Figura 5 se muestra los egresos hospitalarios en menores de 1 año de edad, sin repetición de pacientes durante los años 2004-2011 y los valores calculados de tasa de egresos hospitalarios sin repetición de pacientes de Fisuras Labio-palatina, según ese valor. Nótese que en la Tabla 2, 3 y 4, y Figuras 5 y 6, no hay corrección del año 2008, descrita en métodos.

Tabla 2: Tasa de Egresos Hospitalarios, sin repetición de casos, en menores de 1 año, período 2004-2011.

Años	Egresos Hospitalarios (EH) no repetidos	Recién Nacidos vivos (rn)	Tasa EH de Fisura Labio-palatina sin Repetición de pacientes por 1000 rn
2004	361	242476	1,49
2005	339	242980	1,40
2006	388	243561	1,59
2007	390	242054	1,61
2008	473	248366	1,90
2009	377	253584	1,49
2010	370	251194	1,47
2011	403	248879	1,62

Figura 5: Gráfico de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año por fisuras labio-palatinas, sin repetición de pacientes, período 2004-2011, en Chile, con suavizamiento exponencial.



Se observa en la Tabla 2 y Figura 5 que no se registra mayores variaciones en la tasa de egresos de Fisuras Labio-palatinas en el período 2004-2011. La tasa de egresos encontrada en este período es en promedio es de $1,57 \times 1000 \text{ rn}$ ($DE \pm 0,15 \times 1000 \text{ rn}$). En el año 2008 se observa un aumento aislado de la tasa de egresos hospitalarios sin repetición de pacientes, que pudiera corresponder a que las Fisuras Labio-palatinas se incorporaron al programa de Garantías Explícitas de Salud (GES) en 2007. Esto puede reflejar un mejor acceso a la resolución quirúrgica y hospitalaria de esta patología, como por ejemplo a un aumento de los egresos hospitalarios por cierre de paladar en caso de fisura palatina aislada, no necesariamente a un aumento de la incidencia.

Al comparar los registros de egresos hospitalarios sin y con repetición de pacientes durante el período 2004-2011, se observa que existe una diferencia entre ambos de 36 egresos hospitalarios anuales en promedio, es decir, de los 423 egresos anuales en promedio durante 2004-2011, el 8,5% de los casos registrados tiene más de un alta médica durante su primer año de vida.

Por otra parte, se obtuvo las tasa de egresos hospitalarios por tipo fisura labio-palatinas desde el año 2004 hasta 2011, agrupadas en fisuras de labio, fisuras de

paladar y fisuras de labio y paladar, sin repetición de pacientes, los cuales se muestran en la Figura 6 y Tabla 3 y 4. Nótese que al analizar los datos sin repetición de número identificador, desaparece el aumento de los egresos hospitalarios durante el año 2008, lo cual refleja que durante el año 2008, dado probablemente al ingreso de esta patología al programa GES, hubo un adelanto de la indicación de cierre de paladar en niños con Fisura Labio-palatina, y en vez de operar el paladar durante los 12-18 meses de edad, se operaron antes de los 12 meses de vida, produciendo un aumento de los egresos hospitalarios con repetición de pacientes.

Figura 6: Tasa de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año por Fisuras Labio-palatinas, sin repetición de casos, período 2004-2011, según tipo de fisura, en Chile, con suavizamiento exponencial.

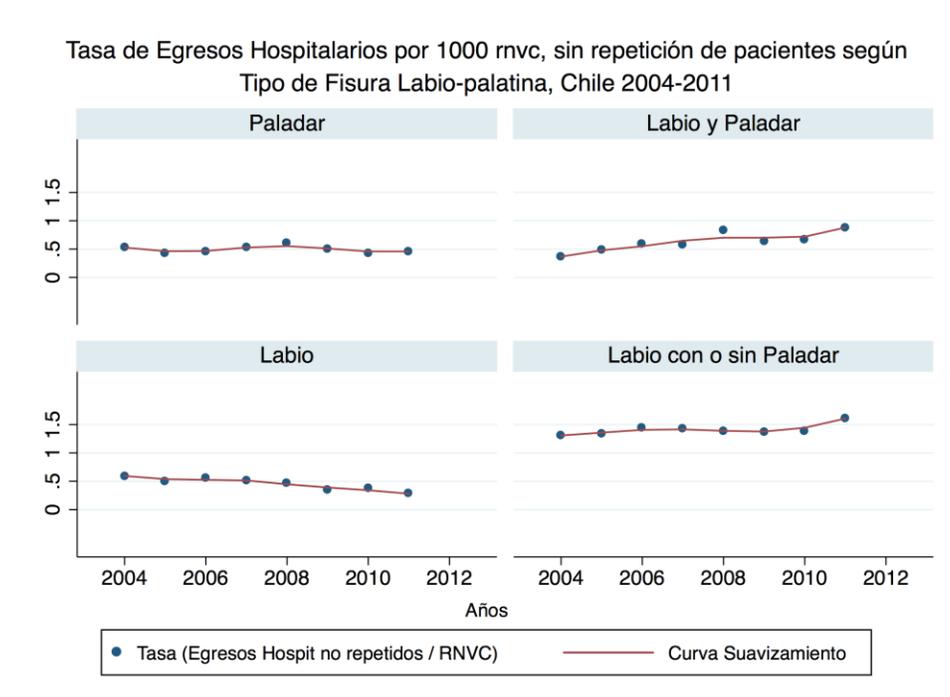


Tabla 3: Tasa de Egresos Hospitalarios (sin repetición de casos), de Fisura Labio-palatina según diagnóstico, en menores de 1 año, período 2004-2011.

Años	Recién Nacidos (rn)	Paladar		Labio y Paladar	
		Número de Egresos Hosp.	Tasa de Egresos Hosp.	Número de Egresos Hosp.	Tasa de Egresos Hosp.
2004	242.476	128	0,53	89	0,37
2005	242.980	103	0,42	117	0,48
2006	243.561	111	0,46	142	0,58
2007	242.054	127	0,52	138	0,57
2008	248.366	150	0,60	206	0,83
2009	253.584	128	0,50	162	0,64
2010	251.194	107	0,43	167	0,66
2011	248.879	114	0,46	219	0,88

Tabla 4: Tasa de Egresos Hospitalarios (sin repetición de casos), de Fisura Labio-palatina según diagnóstico, en menores de 1 año, período 2004-2011.

Años	Recién Nacidos (rn)	Labio		Labio con o sin paladar	
		Número de Egresos Hosp.	Tasa de Egresos Hosp.	Número de Egresos Hosp.	Tasa de Egresos Hosp.
2004	242.476	144	0,59	233	0,96
2005	242.980	119	0,49	236	0,97
2006	243.561	135	0,55	277	1,14
2007	242.054	125	0,52	263	1,09
2008	248.366	117	0,47	323	1,30
2009	253.584	87	0,34	249	0,98
2010	251.194	96	0,38	263	1,05
2011	248.879	70	0,28	289	1,16

Al analizar la tasa de egresos hospitalarios con pacientes no repetidos, y según diagnóstico, se observa que han existido cambios paulatinos en algunos tipos de Fisuras Labio-palatinas, especialmente con las fisuras de labio y fisuras de labio y paladar. En relación a las fisuras de paladar existe una tendencia a mantenerse con una curva estable en el período y con un promedio de 0,49 (IC 95% 0,44-0,53) egresos hospitalarios por 1.000 rn. Para las fisuras de labio existe una tendencia a la disminución durante los años 2004-2011, presentando un máximo de 0,59 por 1.000 rn en el año 2004 a 0,28 por 1.000 rn en el año 2011 (promedio de 0,45 IC 95% 0,36-0,54 egresos hospitalarios por 1.000 rn). Al agrupar los años 2004-2007 y 2008-2011, se observa 46% más casos de fisuras de labio durante los años 2004-2007, que en los años 2008-2011 (OR 1,46, IC 95% 1,27-1,67, $p < 0,01$). Las curvas de fisuras de labio con o sin paladar, que representan la suma de las fisuras de labio y las fisuras de labio y paladar, presentan un aumento, a expensas de las fisuras de labio y paladar. Las fisuras de labio con o sin paladar presentan un mínimo de 0,96 egresos hospitalarios por 1.000 rn en el año 2004 a 1,16 egresos hospitalarios por 1.000 rn en el año 2011 (promedio de $1,08 \pm DE 0,12$ egresos hospitalarios por 1.000 rn). Las fisuras de labio y paladar han aumentado en un 50%, si se compara los años 2004-2007 y 2008-2011 (OR 0,67, IC 95% 0,59-0,75, $p < 0,01$), presentando un aumento absoluto y porcentual (Figura 7).

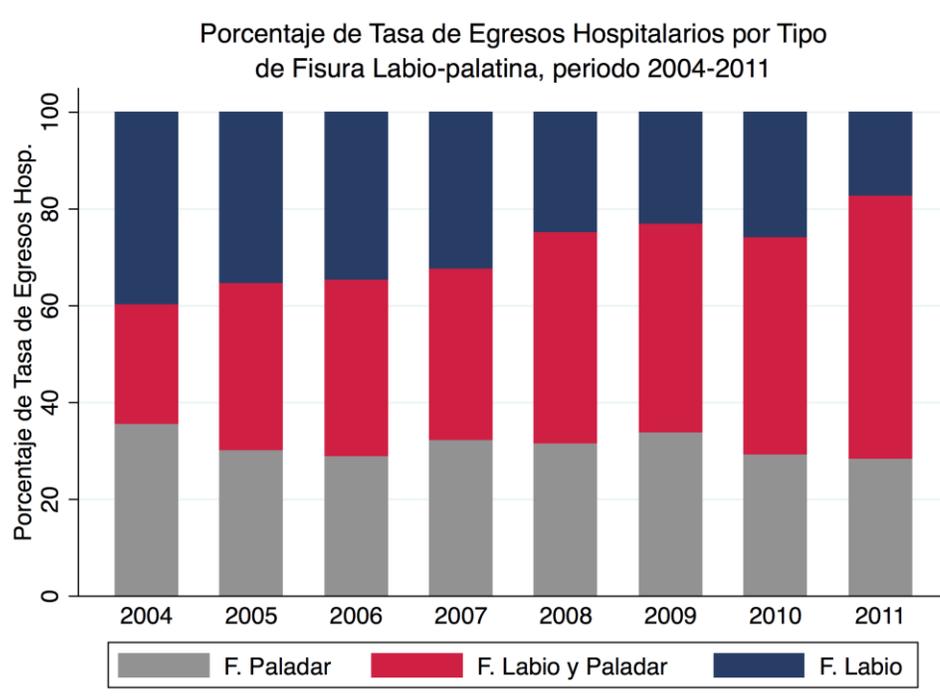
Distribución proporcional de las Fisuras Labio-palatinas según tipo:

La distribución porcentual de las tasas de egresos hospitalarios (sin repetición de casos), según tipo de diagnóstico, se muestran en la Tabla 5 y Figura 7. Se observa que las fisuras de labio con o sin paladar son el tipo de fisura más frecuente, con un 68,8% de los egresos hospitalarios entre los años 2004-2011, en los menores de 1 año. El restante, 31% de total de los egresos hospitalarios en menores de 1 año, en promedio, se deben a fisuras de paladar aislada.

Tabla 5: Distribución de los Porcentaje de las tasas de egresos (sin repetición de casos), por Tipos de Fisuras Labio-palatina y año, período 2004- 2011, en menores de 1 año, Chile.

Años	% F. de paladar	% F. de labio y paladar	% F. de labio	% F. de labio con o sin paladar
2004	35,56	24,85	39,63	64,44
2005	30,48	34,40	35,12	69,52
2006	29,06	36,41	34,53	70,94
2007	32,35	35,38	32,27	67,65
2008	31,74	43,58	24,68	68,26
2009	34,08	43,05	22,87	65,92
2010	29,39	44,81	25,80	70,61
2011	28,36	54,35	17,29	71,64

Figura 7: Distribución Porcentual de Tasa de Egresos Hospitalarios en menores de 1 año con Fisuras Labio-palatinas, sin repetición de casos, período 2004-2011, según tipo de fisura, en Chile.



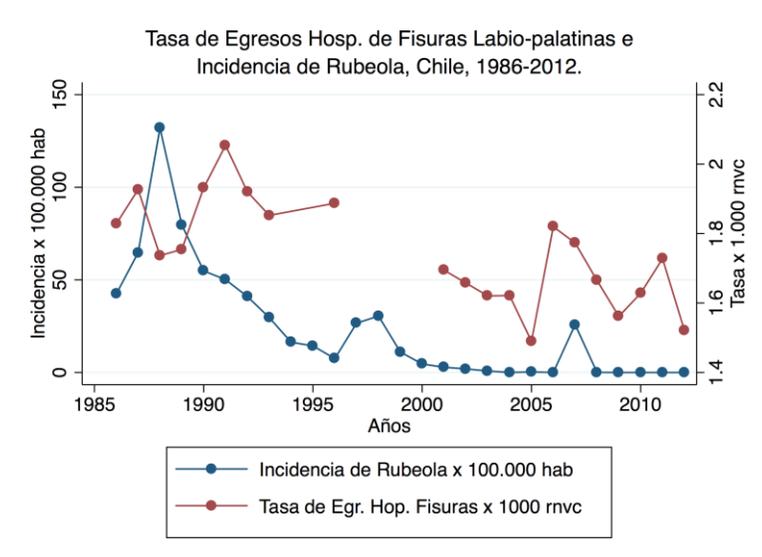
En el período existe una disminución porcentual de la tasa de egresos de fisuras de labio y un aumento de la tasa de egresos de fisuras de labio y paladar durante el período 2004-2011, manteniéndose relativamente constante las fisuras de paladar.

Análisis de Tendencia de la variable respuesta y las variables explicatorias:

Se analizó en forma descriptiva y en forma gráfica, la relación entre la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y las variable explicatorias incluidas.

En la Figura 8 se observa que existe una disminución de la incidencia de rubeola en el país, para luego presentar un aumento durante los años 1997-1998, asociado a un disminución posterior y un aumento aislado en el año 2007. Esta disminución después del 1998, es concomitante temporalmente con la caída de la tasa de egresos hospitalarios de fisuras labio-palatinas.

Figura 8: Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas e incidencia de Rubeola en Chile, 1986-2012.



Existe una disminución del porcentaje de pobreza e indigencia del país durante el período lo cual se observa con una tendencia negativa, al igual de la tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas. Ver Figura 9 y 10.

Figura 9: Gráfico de Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y Porcentaje de Pobreza en Chile, 1986-2012.

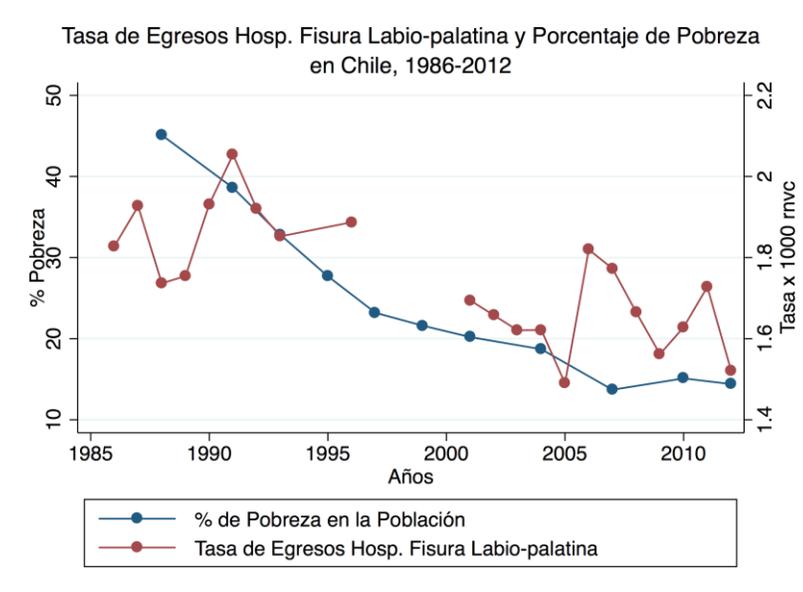
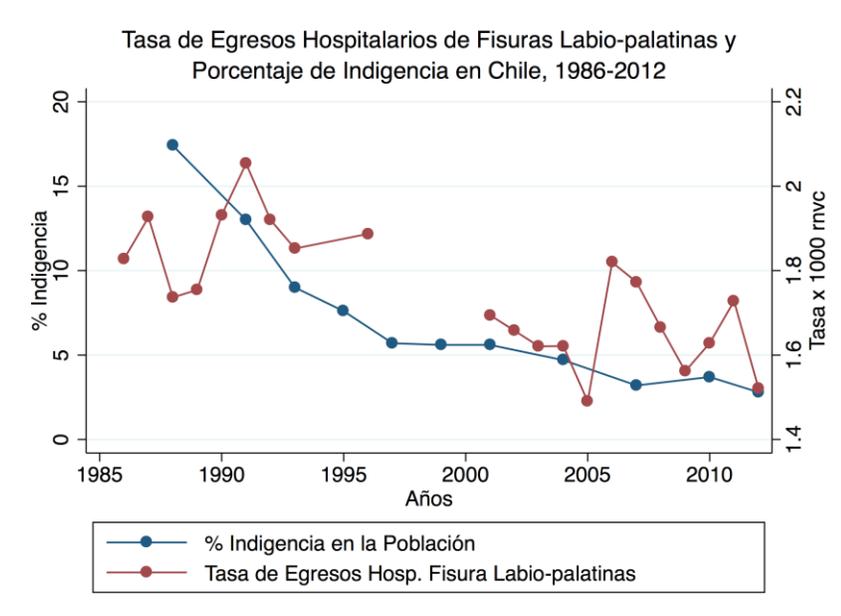
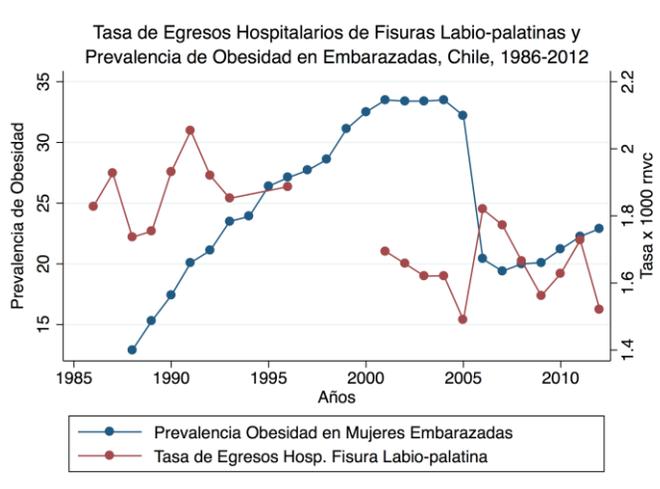


Figura 10: Gráfico de Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y Porcentaje de Indigencia en Chile, 1986-2012.



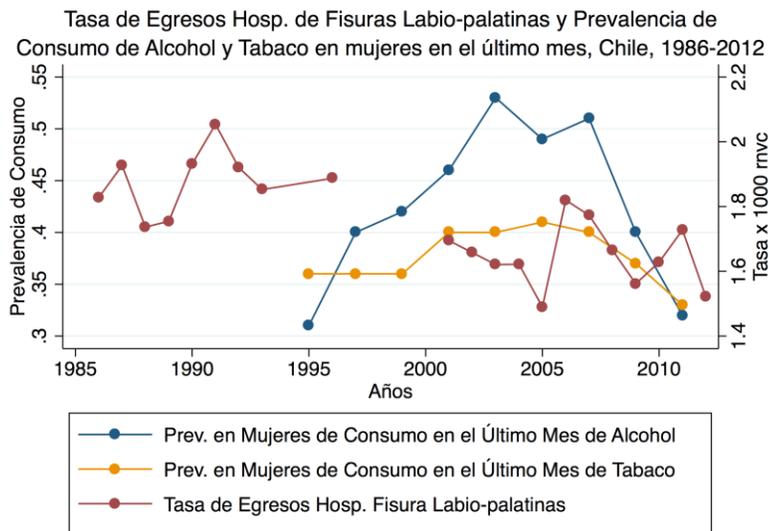
Existe un aumento en el porcentaje de obesidad en embarazadas del país durante el período, con un cambio brusco en la curva, en el año 2006. Después del 2006 se mantiene en aumento, pero en un nivel inferior. Esto es dado a un cambio en la forma de medición de obesidad en embarazadas, lo cual se discutirá en la discusión de esta tesis. Llama la atención unas pequeñas fluctuaciones en el gráfico, lo cual habla de cierta inestabilidad del registro. Este aumento es inverso a la disminución de la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas (Figura 11).

Figura 11: Gráfico de Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y Porcentaje de Obesidad en Embarazadas, Chile, 1986-2012.



El consumo de alcohol presenta un aumento desde 1995-2003, para luego presentar una disminución después del 2007 y en relación a consumo de tabaco un aumento del consumo en 1999 hasta el 2005, para luego presentar una disminución después del 2005 (Ver Figura 12). La disminución de la tasa de egresos de Fisuras Labio-palatinas es inversa al aumento del consumo de alcohol y tabaco en el período.

Figura 11: Gráfico de Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas y Consumo de Alcohol y Tabaco en mujeres en el último mes, Chile, 1986-2012.



Análisis Univariado con Método de Prais-Winsten:

Como se informa en Métodos, analizamos la asociación entre las tendencias temporales con un método univariado de Prais-Winsten (cada variable explicatoria con la tasa de egresos hospitalarios), con datos colapsados, es decir con los promedio con sus desviaciones estándar de cada período quinquenal (ver métodos). Se observa que la variable con mayor significancia es la variable subrogante de la implementación de la fortificación del ácido fólico (pre y post fortificación), con una disminución de 0,24 puntos en la tasa de egresos hospitalarios de fisuras por 1000 nv, al comparar el período post versus pre-fortificación. Otras tres variables alcanzan también significación estadística en los análisis univariados: el porcentaje de pobreza, el porcentaje de indigencia en el país y el tiempo agrupado en quinquenios. La tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas disminuyó 0,065 egresos por 1.000 nv (IC 95% 0,115 ; 0,0115) (p=0,023), por cada cambio de quinquenio y disminuyó 0,026 egresos por 1.000 m (IC 95% 0,0015 ; 0,05) (p=0,042), por cada 1% de disminución de la indigencia en el país. Las variables incidencia de rubeola, porcentaje de consumo de alcohol y tabaco en mujeres en el último mes y porcentaje de embarazadas no se muestran asociados a la tasa de egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas con este método (Tabla 6).

Tabla 6: Asociación univariada de las series de Tasas de Fisura Labio-palatina y de las variables explicatorias: Chile, menores de 1 año, 1986- 2012.

Variable Explicada	Beta	EE	Valor p	IC 95%
Quinquenio	-0,065	0,018	0,023	-0,11 ; -0.015
Pre-Post	-0,24	0,0203	<0,01	-0,26 ; -0.12
Pobreza	0011	0,0032	0,028	0,0019 ; 0.020
Indigencia	0,026	0,0088	0,042	0,0015 ; 0,0506
Rubeola	0,0029	0,0019	0,21	-,0025 ; 0.0084
Obesidad Emb	-0,0073	0,0096	0,488	-0,034 ; 0.019
Tabaco Muj	1,165	3,259	0,739	-7,885 ; 10,21
Alcohol Muj	-0,908	1,648	0,611	-5,485 ; 3,668

* Análisis univariados de Prais-Winsten con datos imputados y colapsados

El método de Prais-Winsten, son conceptualmente más apropiados para el problema; sin embargo, puesto su utilización –así como la de los demás análisis de series de tiempo de manera general- requeriría una serie más larga que la de 1986-2012 con la que contamos. Considerando esta eventual violación de este supuesto, así como también la de interrupciones en las series, se efectuó una análisis con modelos mixtos. Este análisis permitirá evaluar si los resultados son dependientes del análisis o se mantiene la coherencia de los hallazgos.

Análisis Univariado con Modelos Mixtos:

Con este análisis se corrobora la disminución la tasa de egresos hospitalarios Fisura Labio-palatina dado por la fortificación de la harina con ácido fólico (Tabla 7).

Tabla 7: Asociación Univariada de las series de Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisura Labio-palatina y la variable subrogante a la fortificación del ácido fólico en la harina, en menores de 1 año durante el período 1986- 2012.

Variable Explicatoria	Variable Explicada	Beta	EE	Valor p	IC 95%
Subrogante a la Fortificación con Ácido Fólico (pre-post)	Tasa Imputada	-0,19	0,036	<0,01	-0,26 ; -0,12
	Tasa	-0,23	0,043	<0,01	-0,31 ; -0,14

* Análisis univariados de Modelos Mixtos con datos imputados, manteniendo a nivel a quinquenios.

Según este análisis (Tabla 7) la diferencia entre los años pre y post intervención nacional con ácido fólico se asocia a una tendencia negativa significativa de las dos representaciones de la tasa de Fisuras Labio-palatinas. De tal forma, el cambio de años sin y con intervención implican una disminución de 0,23 por 1.000 rn en la Tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas, prácticamente igual resultado que con el resultado precedente.

Con estos modelos mixtos efectuamos también un análisis univariado buscando asociación entre la variable respuesta y las demás variables explicatorias, manteniendo como nivel a quinquenios, el cual se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Asociación Univariada entre Tasa de Egresos Hospitalarios de Fisura Labio-palatina y otras variables explicatorias, en menores de 1 año durante el período 1986- 2012.

Variable Explicatoria	Beta	EE	Valor p	IC 95%
Pre-Post	-0,23	0,043	<0,01	-0,31 ; -0,14
Rubeóla	0,001	0,0009	0,280	-0,0008 ; 0,0028
Indigencia	0,0198	0,0064	0,002	0,0072 ; 0,032
Pobreza	0,0092	0,0026	0,001	0,0039 ; 0,014
Alcohol Muj	0,0204	0,4876	0,676	-0,7520 ; 1,159
Tabaco Muj	1,1682	1,2833	0,363	-1,3469 ; 3,683
Obesidad Emb	-0,0053	0,006	0,378	-0,017 ; 0,006

* Análisis univariados de Modelos Mixtos con datos imputados, manteniendo a nivel a quinquenios.

Las variables que mantienen asociación entre la Tasa de egresos de Fisura Labio-palatina son el porcentaje de pobreza e indigencia anual en el país y la variable subrogante a la intervención.

1.- Variable tiempo agrupada en períodos pre-fortificación (1986-2000) y post-fortificación (2001-2012): constituye un proxy (variable subrogante) de la intervención, dado que el año 2000, se implementa la fortificación de la harina con ácido fólico en Chile. La tasa promedio de Fisura Labio-palatina por 1.000 nv desciende en 0,23 puntos (IC 95%-0,31 ; -0,14) ($p < 0,01$), después de la implementación de la fortificación.

2.- Indigencia: la variable indigencia se decide mantener en el modelo dado que presenta significancia estadística con la variable respuesta. Existe una disminución de 0,02 egresos por 1.000 nv de fisuras labio-palatinas (IC 95% 0,0072 ; 0,032) ($p = 0,002$), por cada 1% de disminución de la pobreza extrema en el país.

3.- Incidencia de Rubeola y Consumo de Tabaco durante el último mes: se dejan estas 2 variables a pesar de no tener significancia, dado la importancia conceptual y su relación establecida en la literatura con el desarrollo de fisura labiopalatina.

Análisis multivariado de la evolución de la fisura labio-palatina en función de las variables predictoras.

Finalmente, asumiendo que el Modelo Prais – Winter es suficientemente robusto para este análisis, se efectuó el análisis conjunto de la asociación entre la proxy de fortificación con ácido fólico (pre-post) con la tasa de Fisura Labio-palatina, ajustando por los eventuales efectos de indigencia, rubeola y tabaco.

Tabla 9: Análisis Multivariado con Modelo Prais-Wintern para Tasa de Egresos Hosp. de Fisura Labio-palatina (Tasa anual imputada) y otras variables explicatorias, en menores de 1 año durante el período 1986- 2012.

Variable Explicatoria	Beta	EE	Valor p	IC 95%
Pre-post	-0,143	0,062	0,031	-0,273 ; 0,014
Indigencia	0,009	0,009	0,333	-0,0105 ; 0,297
Rubeola	-0,0008	0,0009	0,352	-0,003 ; 0,001
Tabaco	0,9805	0,9848	0,330	-1,062 ; 3,023

Análisis Multivariado de Modelo Prais-Wintern con datos imputados

El modelo ajustado muestra una disminución de la pendiente (Beta) de la variable subrogante a la fortificación con ácido fólico en la harina de trigo (pre-post), pero manteniendo la significancia estadística, lo que no ocurre con las otras variables explicatorias. Es decir, la fortificación de ácido fólico en la harina en el año 2000 en Chile, se asocia con una disminución de la tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas en 0,14 puntos (IC 95% -0,273 ; -0,014; p=0,031), ajustando por porcentaje de pobreza nacional, incidencia de rubeola y consumo de tabaco en el último mes en mujeres.

Se buscaron interacciones entre las variables predictoras y la tasa de egresos hospitalarios, pero no se encontraron.

DISCUSIÓN:

La fortificación de alimentos con ácido fólico ha logrado disminuir la incidencia de defectos del tubo neural, en Chile y en distintos países del mundo, pero es controversial su efecto sobre las Fisuras Labio-palatinas. Esta tesis explora los eventuales efectos sobre la incidencia de Fisuras Labio-palatinas, a través de egresos hospitalarios, después de la incorporación de ácido fólico en la fortificación de la harina en Chile, implementada en el año 2000. Con estos resultados, podemos decir que luego de la implementación del programa de fortificación de la harina de trigo con ácido fólico, se detecta una disminución concomitante de la tasa de egresos hospitalarios de las Fisuras Labio-Palatinas de los menores de 1 año.

La curva de egresos hospitalarios en menores de 1 año por Fisuras Labio-Palatinas durante 1986 a 2012, muestra una disminución de cerca de 120 egresos hospitalarios por año, después del año 2000; es decir una disminución de la tasa de egresos hospitalarios de 1,88 por 1.000 rn, en promedio en el período pre-fortificación a una tasa de egresos promedio de 1,7 por 1.000 rn, en el período post-fortificación, lo cual implica que existía un riesgo 9% mayor en el período pre-fortificación, que en el post-fortificación. Aunque no se puede descartar que se trate de un problema de registros, esta es una evidencia que aporta en el sentido de la existencia de la asociación.

El estudio tiene limitaciones que es necesario sopesar. En primer lugar, los registros de egresos hospitalarios, pueden no reflejar fielmente todos los casos de recién nacidos con Fisuras Labio-palatinas, en una población. Por ejemplo, puede haber sub-diagnóstico de las Fisuras Labio-palatinas en mortinatos, poli-malformados o algunos casos de mortalidad neonatal que no se registraron durante su estada en el servicio de neonatología o maternidad; también pueden existir casos de fisuras de paladar aislada o fisura submucosa, que tengan diagnóstico ambulatorio más tardío y que presenten resolución quirúrgica después del año de vida, por lo que no quedarían registrados dada nuestra aproximación con los egresos por esta causa en menores de 1 año. Por otra parte, podrían ocurrir repeticiones debidas a casos con más de un alta médica por procedimientos quirúrgicos relacionados. Esto ocurriría en casos con fisura de labio y paladar que hayan tenido ambos procedimientos (queiloplastía primaria y cierre de paladar) antes del año de vida. En la Guías Clínicas GES de Fisura Labio-palatina creada el 2007, se plantea que el cierre de paladar completo se puede realizar

durante los 12 - 18 meses de edad o en dos etapas, con cierre del paladar blando durante los 6 - 12 meses de edad, y cierre paladar duro a los 15 -18 meses de edad.(6) A fin de evaluar la magnitud de este eventual sesgo, se utilizó los datos entre los años 2004 y 2011 que permiten corregir por caso, observándose una diferencia promedio de 36 egresos hospitalarios. Es decir, sólo 36 casos tuvieron más de un egreso hospitalario durante el primer año de vida, lo cual representa el 8.5% de los egresos hospitalarios totales, aproximadamente.

A pesar de estas limitaciones, la tasa de egresos hospitalarios es una buena aproximación a la incidencia de Fisuras Labio-palatinas, dado que estos se han mantenido estables en el período de estudio. La incorporación de las Fisuras Labio-palatinas al programa de Garantías Explícitas de Salud en 2007, produjo un aumento de los egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas, en 2008, en forma aislada, incluso en los datos sin repetición de pacientes, pero en mucho menor magnitud. Esto puede tener explicación por un aumento de las oportunidades de resolución médica-quirúrgica, sin necesariamente reflejar un aumento de la incidencia real. Pese a esa alza, aún se observa la disminución de la tasa de los egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas al comparar el período pre-fortificación y post-fortificación.

Otros factores ambientales que se han planteado asociados a las Fisuras Labio-palatinas, como el alcohol, tabaco, obesidad, o infecciones durante el embarazo, por ejemplo, rubeóla. Estas variables no se encontraron asociados a la disminución de los egresos hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas después del año 2000, en este trabajo. Aunque según el Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol de Chile (SENDA)(76,84) se ha observado una disminución en la prevalencia del consumo anual y mensual de alcohol y tabaco, en las mujeres en edad fértil, esta ocurrió después del año 2006 y en nuestro estudio no se presenta asociada temporalmente a la tasa de egresos hospitalarios por Fisura Labio-palatina. Esto se confirma con el análisis de modelos mixtos, el cual no encontró asociación temporal entre la Tasa de Fisura Labio-palatina y los cambios en la prevalencia del consumo de alcohol y tabaco en mujeres.

Algunos autores plantean que existe asociación entre Fisura Labio-palatinas y nivel socioeconómico.(30,92) En nuestros resultados encontramos asociación entre el porcentaje de pobreza e indigencia del país y la tasa de egresos de Fisura Labio-palatinas. Esta asociación pierde significancia estadística en el análisis multivariado, por

lo que la mejor explica la disminución de la tasa de egresos de hospitalarios de Fisuras Labio-palatinas es la variable subrogante de implementación de la fortificación de ácido fólico en la harina.

En cuanto a la prevalencia de obesidad en las embarazadas a nivel nacional y según la objetivos sanitarios 2000-2010, se observó un aumento paulatino de la prevalencia de la obesidad en embarazadas hasta el año 2001, para luego mantenerse en una meseta del 33% hasta el año 2004, según la medición de Roose-Mardones. Desde el año 2005 la forma de medición de obesidad en embarazadas cambió, usándose el Índice de Masa Corporal (IMC), encontrándose una meseta en la tendencia de la prevalencia de obesidad en embarazadas cercana al 20% durante los años 2005-2008.(86) La obesidad en embarazadas no se encontró asociada a la tasa de egresos hospitalarios por Fisuras Labio-palatinas comparando los años 1986 a 2004, ni al comparar el período completo.

En cuanto a las infecciones durante el embarazo, existió un aumento de la incidencia de rubeóla congénita después un brote de rubeola en la población chilena, durante los años 1997 y 1998. Con el objetivo de disminuir de la incidencia de rubeóla congénita, se aplicó una campaña de vacunación dirigida a mujeres entre 10 y 29 años, alcanzando una cobertura del 99% de la población, en el año 1999.(79) Con esto se logró disminuir los casos de rubéola congénita, desde 18 casos durante el período 1999-2000, a cero casos durante los años 2000-2007. Durante el año 2008 se presentaron 3 casos de rubeóla congénita asociados a un brote nacional entre 2007-2008, por lo que se aplicó una nueva campaña de vacunación, esta vez dirigida a hombres entre 19 a 29 años de edad, con una cobertura de 92%. No se han presentado nuevos casos de rubeóla congénita hasta la fecha en el país. A pesar que la disminución del brote de rubeóla con la implementación de la vacunación en el año 1999, la cual es concomitante con la disminución de la incidencia de Fisuras Labio-palatinas observadas en este estudio, la disminución de los casos de rubeóla congénita no dan cuenta de la disminución de más de 120 casos de Fisuras Labio-palatinas, por lo que no se podría explicar esta disminución solamente por la vacunación contra la rubéola. Esto es coherente con al análisis de modelos mixtos, lo cual no encuentra asociación entre incidencia de rubeola en la población y tasa de egresos de Fisuras Labio-palatinas durante el período estudiado.

Si comparamos estos resultados con los encontrados después de la fortificación de alimentos en otros países, podemos decir, que en Chile existió una disminución del riesgo a diferencia de los estudios Canadienses, quienes no encuentran una diferencia en la incidencia después de la fortificación de cereales(13,94). En cambio, este efecto es cercano a los valores encontrados en Estados Unidos y Brasil, después de la fortificación de los cereales y la harina, respectivamente. (16,18,23)

Dado las dificultades para encontrar un registro que refleje fielmente la incidencia de esta patología en la realidad nacional se destaca la necesidad imperiosa de generar un Registro Nacional de Malformaciones Congénitas, donde se incluya los pacientes con Fisura Labio-palatinas, así como otros defectos congénitos. Los esfuerzos del ECLAMC responden a esta necesidad, pero incluye sólo a algunas maternidades del país, no todas, siendo estas maternidades centros de derivación regional, lo cual puede entregar incidencias más altas a la realidad nacional. Por otra parte el ingreso de esta patología en el programa GES implementado el año 2007, permitirá llevar un acucioso registro de las fisuras cráneo-faciales y su seguimiento y resultados a tratamientos.

Un hallazgo importante que requiere mayor análisis, es la disminución de las fisuras de labio y un aumento de las fisuras de labio y paladar, manteniéndose constante la tasa de egresos por fisuras de paladar aisladas. Las fisura de labio y paladar son defectos que tienen un compromiso estético-funcional más severo y requiere tratamientos más complejos, en comparación a las fisuras de labio, cuando no presentan fisura del paladar. Como hipótesis se puede plantear que, dado que la fisiopatología para el desarrollo de estos defectos es multifactorial, incluyendo elementos ambientales en conjunto con una predisposición genética de la población, la disminución de las fisuras labiales se debe a que esta malformación ha sido permeable a los cambios ambientales que se han ocurrido en el período 2004-2011. Uno de los factores ambientales que podría estar participando es la mejoría de la distribución del ácido fólico en los molinos de harina del país, la cual aún no llega a los niveles homogéneos deseados, presentando importantes diferencias intra-molinos e inter-molinos de los niveles de este micronutriente.(55,58) Es así como, eventualmente podríamos observar que persista una disminución de los casos de fisuras de labio hasta llevar a los niveles deseados de ácido fólico en los molinos del país. El aumento absoluto los egresos hospitalarios de las fisuras de labio y paladar, durante los años

2008-2011, puede reflejar un aumento de la incidencia real o un aumento del acceso y oportunidad para la resolución de esta patología, dado el ingreso de esta al programa de Garantías Explícitas de Salud (GES), por lo que estos resultados deben ser interpretados con cautela. Parece poco probable que entre 2004 a 2011 exista un sesgo de sobrevida, es decir, que las fisuras labio y paladar en estos pocos años han podido sobrevivir con mayor eficiencia al periodo neonatal y que esto refleje un aumento de los egresos hospitalarios porque llegan a operarse. Esto es poco probable dado que los recién nacidos con fisura de labio y paladar, no sindromática, no presentan una malformación fatal, y a pesar que pueden tener dificultades en la alimentación en una fase inicial, logran incorporar peso y presentar un adecuado desarrollo en su primer año de vida. Se ha planteado por algunos autores (95–97) que existe la asociación entre aumento de la edad materna y la fisuras labio y paladar no sindromática, lo cual podría ser una explicación para el aumento absoluto y porcentual de las fisuras de labio y paladar durante 2004-2011, en nuestra población (98,99), lo cual requiere mayor investigación a nivel nacional.

Se ha planteado que el desarrollo del las Fisuras Labio-palatinas se deben a un conjunto de factores, que incluyen elementos ambientales y genéticos. Entre los factores ambientales que se han encontrado que aumenta el riesgo de desarrollar Fisura Labio-palatina, son el consumo de tabaco y alcohol durante el embarazo, teratógenos específicos como el ácido valproico, deficiencia de zinc, pesticidas, obesidad materna, estrés materno, radiaciones, infección perinatal y nivel socio-económico.(28) Todos estos factores pueden haber variado en Chile durante el período estudiado. A pesar que tratamos de controlar o ajustar por algunas variables poblacionales que pueden estar asociadas a Fisura Labio-palatinas, pueden haber otras no incluidas en el modelo.

Por otra parte, nuestro estudio es ecológico y por lo tanto está sujeto a los sesgos reconocidos de este diseño (100,101); sin embargo, postulamos que no hay otra forma de estudiar este problema una vez que la intervención ya existe y que lo que interesa es conocer, a nivel poblacional, si es posible detectar beneficios adicionales, así como también es la forma de evidenciar eventuales efectos no deseados.(102)

Considerando lo anterior, aunque no es posible afirmar taxativamente que hay una asociación causal entre la fortificación con ácido fólico, estos resultados constituyen un aporte valioso referente a eventuales efectos poblacionales del ácido fólico.

CONCLUSIONES:

Podemos concluir que luego de la implementación de la fortificación de la harina de trigo con ácido fólico, se detecta una disminución concomitante de la tasa de egresos hospitalarios de las Fisuras Labio-Palatinas de los menores de 1 año, lo cual pudiese reflejar una disminución de la incidencia de esta malformación, en el período 1986-2012. Esto se observa a pesar del ingreso de esta patología al programa de Garantías Explícitas de Salud (GES) en el año 2007, y no se explica por otras variables que pudieron cambiar en el país en el período como cambios en el nivel de pobreza o indigencia, incidencia de rubeóla, obesidad en embarazadas o cambios de consumo de tabaco o alcohol en mujeres.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ford A, Tastets E, Cáceres A. Tratamiento de la fisura labio palatina. *REv Med Clin Condes*. 2010;21(1):16–25.
2. Monaterios L. Tratamiento interdisciplinario de las fisuras labio palatinas. Primera Edición. Santiago, Chile: Impresora Óptima S.A; 2009. p.73-82.
3. Brito LA, Meira JGC, Kobayashi GS, Passos-Bueno MR. Genetics and management of the patient with orofacial cleft. *Plast Surg Int*. 2012;2012:782821.
4. Hughes CF, Ward M, Hoey L, McNulty H. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Ann Clin Biochem* 50(4). 2013;50:315.
5. Kelly D, Reulbach U. Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants : a population-based cohort study. *Br JGenPract*. 2012;466–72.
6. Ministerio de Salud, MINSAL. Guia Clinica Fisura Labiopalatina. Santiago Chile; 2009.
7. Klassen AF, Tsangaris E, Forrest CR, Wong KWY, Pusic AL, Cano SJ, et al. Quality of life of children treated for cleft lip and/or palate: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Elsevier Ltd; 2012;65(5):547–57.
8. Camelo JL. La fortificación de harinas con ácido fólico reduce la frecuencia de los defectos del tubo neural en Sudamérica. *J Basic Appl Genet*. 2010;21(2):1–5.
9. De-regil L, Fernández-gaxiola A, Dowswell T, Peña-rosas J. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(10): 1-141.
10. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, et al. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations: are the recommendations working? *BMJ*. 2005;330(7491):571-6.
11. Liao Y, Wang J, Li X, Guo Y, Zheng X. Identifying environmental risk factors for human neural tube defects before and after folic acid supplementation. *BMC Public Health*. 2009;9:391-9.
12. Wilson RD, Johnson J-A, Wyatt P, Allen V, Gagnon A, Langlois S, et al. Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2007;29(12):1003–26.

13. Ray JG, Meier C, Vermeulen M, Wyatt PR, Cole DE. Association between folic acid food fortification and congenital orofacial cleft. *J Pediatr.* 2003;143:805–7.
14. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008;37(5):1041–58.
15. Cortés F, Mellado C, Pardo R, Villarroel L, Hertrampf E. Wheat flour fortification with folic acid: Changes in neural tube defects rates in Chile. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(8):1885–90.
16. Yazdy MM, Honein M a, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79(1):16–23.
17. Little J, Gilmour M, Mossey P a, Fitzpatrick D, Cardy a, Clayton-Smith J, et al. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008;45(4):428–38.
18. Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS, et al. Changes in the Birth Prevalence of Selected Birth Defects after grain fortification with folic acid in the united States: Findings from a Multi-State Population-Based Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73:679–89.
19. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra MDG, Nazer-Herrera J. Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet A.* 2003;123A(2):123–8.
20. López-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(10):2444–58.
21. Nazer H J, Cifuentes O L, Aguila R A, Juárez H ME, Cid R MP, Godoy V ML, et al. [Effects of folic acid fortification in the rates of malformations at birth in Chile]. *Rev Med Chil.* 2007;135(2):198–204.
22. Davis J, Ritchie H. Classification Of Congenital Clefts Of The Lip And Palate: With A Suggestion For Recording These Cases. *JAMA.* 1922;79(16):1323-1327.
23. Souza J, Raskin S. Clinical and epidemiological study of orofacial clefts. *J Pediatr (Rio J).* Sociedade Brasileira de Pediatria; 2013;89(2):137–44.
24. Czeizel a. E, Timar L, Sarkozi a. Dose-dependent Effect of Folic Acid on the Prevention of Orofacial Clefts. *Pediatrics;* 1999;104(6):1–7.
25. Hector M, Barboza P, Cantero C, Fierro C. Letter To The Editor. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 2002;39(5):571.

26. Soza GC, Benitez L, Ibaceta M, Peña R, Garcia M, Morales C. Malformaciones congénitas . Incidencia en la raza mapuche. *Rev Chil Pediatr.* 1977;48:147–52.
27. Wehby GL, Félix TM, Goco N, Richieri-Costa A, Chakraborty H, Souza J, et al. High dosage folic acid supplementation, oral cleft recurrence and fetal growth. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(2):590–605.
28. Dixon M, Marazita M, Beaty T, Murray JC. Cleft lip and Palate: synthesizing generic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167–78.
29. Obican SG, Finnell RH, Mills JL, Shaw GM, Scialli AR. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *FASEB J.* 2010;24(11):4167–74.
30. Wehby G, Murray JC. Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence. *Oral Dis.* 2011;16(1):11–9.
31. Mitchell LE. Genetic epidemiology of birth defects: nonsyndromic cleft lip and neural tube defects. *Epidemiol Rev.* 1997;19(1):61–8.
32. Nazer H J, Ramirez MC, Cifuentes L. 38 Años de vigilancia epidemiológica de labio leporino y paladar hendido en la maternidad del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. *Rev Med Chile.* 2010;(138):567–72.
33. WHO. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies. Geneva, Switzerland; 2002.
34. Molina-Solana R, Yañez-Vico R., Iglesias-Linares A, Mendoza-Mendoza A, Solano-Reina E. Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42:177–84.
35. Honein M a, Rasmussen S a, Reefhuis J, Romitti P a, Lammer EJ, Sun L, et al. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2007 Mar;18(2):226–33.
36. Wyszynski D, Duffy D, Beaty T. Maternal Cigarette Smoking and Oral Cleft: A Meta-analysis. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 1997;34(3):206–10.
37. Okumura K, Tsukamoto H. Folate in smokers. *Clin Chim Acta.* 2011;412(7-8):521–6.
38. DeRoo L a, Wilcox AJ, Drevon C a, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(6):638–46.
39. Medici V, Halsted CH. Folate, alcohol, and liver disease. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(4):596–606.

40. Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M, Starr JR. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2010;24(5):502–12.
41. Safi J, Joyeux L, Chalouhi GE. Periconceptional folate deficiency and implications in neural tube defects. *J Pregnancy.* 2012;2012:1-9.
42. Shah D, Sachdev HPS. Zinc Deficiency in Pregnancy and Fetal Outcome. *2006;64(1):15–30.*
43. Hozyasz KK, Kaczmarczyk M, Dudzik J, Bulska E. Relation between the concentration of zinc in maternal whole blood and the risk of an infant being born with an orofacial cleft. *British J of Oral Maxillofacial Surgery.* 2009;47:466–9.
44. Weingaertner J, Fanghaenel J, Bienengraeber V, Gundlach KKH. Initial findings on teratological and developmental relationships and differences between neural tube defects and facial clefting. First experimental results. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005;33(5):297–300.
45. Weingärtner J, Lotz K, Fanghänel J, Gedrange T, Bienengräber V, Proff P. Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. *J Orofac Orthop.* 2007;68(4):266–77.
46. Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman a M, Spauwen PH, Steegers E a, Thomas CM, et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology.* 1999;60(5):253–7.
47. Butterworth CE, Bendich a. Folic acid and the prevention of birth defects. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:73–97.
48. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients.* 2011;3(3):370–84.
49. A Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline and Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Food and Nutrition Board I of M. Dietary Reference Intake Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, D.C.; 1998.
50. Gary M. Shaw, Vollset SE, Carmichael SL, Yang W, Finnell RH, Blom H, et al. Nested case-control study of one-carbon metabolites in mid- pregnancy and risks of cleft lip with and without cleft palate. *Pediatr Res.* 2009;66(5):501–6.

51. Fryer A a, Emes RD, Ismail KMK, Haworth KE, Mein C, Carroll WD, et al. Quantitative, high-resolution epigenetic profiling of CpG loci identifies associations with cord blood plasma homocysteine and birth weight in humans. *Epigenetics*. 2011;6(1):86–94.
52. Hartridge T, Illing HM, Sandy JR. The role of folic acid in oral clefting. *Br J Orthod*. 1999;26(2):115–20.
53. Chai Y, Maxson RE. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006;235(9):2353–75.
54. Hertrampf E, Cortes F, Erockson D, Cayazzo M, Freire W, Bailey LB, et al. Communication Consumption of Folic Acid – Fortified Bread Improves Folate Status in Women of Reproductive Age in Chile. *J Nutr*. 2003; 1999:3166–9.
55. Raymond E. Informe Programa de Fortificación de las Harinas. Departamento de Salud Ambiental Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago, Chile; 2008.
56. Mills JL, Signore C. Neural tube defect rates before and after food fortification with folic acid. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004;70(11):844–5.
57. Castillo C, Tur J, Uauy R. Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile. Consecuencias no intencionadas. *Rev Med Chil*. 2010;138:832–40.
58. Ministerio de Salud, MINSAL. Programa Fortificación De Harinas. Subsecretaría de Salud Pública. Instituto de Salud Pública de Chile Año 2011;1–20.
59. Aguilera X, Gonzalez C, Guerrero A, Burgos A. Objetivos Sanitarios para la década 2000-2010: Evaluación a mitad del período. Santiago; 2010. Available from: www.epi.minsal.cl
60. Llanos A, Hertrampf E, Cortes F, Pardo A, Grosse SD, Uauy R. Cost-effectiveness of a folic acid fortification program in Chile. *Health Policy (New York)*. 2007;83:295–303.
61. Ewings EL, Carstens MH. Neuroembryology and functional anatomy of craniofacial clefts. *Indian J Plast Surg*. 2009;42 Suppl:S19–34.
62. Tessier P. Anatomical Classification of facial, cranio-facial and latero-facial clefts. *J Maxillofac Surg*. 1976;4(0):69–92.
63. Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal Craniofacial Development: New Insights on Normal and Abnormal Mechanisms. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995. 368-422 p.
64. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):113–29.

65. Goh YI, Bollano E, Einarson T, Koren G. Prenatal Multivitamin Supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obs Gynaecol Can.* 2006;28(8):680–9.
66. Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007;79(1):8–15.
67. Muñoz LA, Sanchez X, Arcos E, Vollrath A, Bonatti C. The motherhood experience in the context of social vulnerability: a comprehensive approach to social phenomenology. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2013;21(4):913–9.
68. Crozier SR, Robinson SM, Borland SE, Godfrey KM, Cooper C. Europe PMC Funders Group Do women change their health behaviours in pregnancy? Findings from the Southampton Women's Survey. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009;23(5):446–53.
69. Solomons NW. Food Fortification with Folic Acid : Has the Other Shoe Dropped ? *Nutr Rev.* 2007;65(11):512–5.
70. Wehby GL, Goco N, Moretti-Ferreira D, Felix T, Richieri-Costa A, Padovani C, et al. Oral cleft prevention program (OCP). *BMC Pediatr.* BMC Pediatrics; 2012 Jan;12(1):184.
71. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. *Lancet.* 2013;381:1029–36.
72. Nan H, Lee EJ, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL, Cho E. Annals of Epidemiology Prospective study of alcohol consumption and the risk of colorectal cancer before and after folic acid fortification in the United States. *Ann Epidemiol.* 2013;23(9):558–63.
73. Segura A, Menu R, Hernandez I, Pons J, Gervas J. Ética y salud pública. Cuadernos de la Fundación Víctor Grifols i Lucas Nº 27. Barcelona, España; 2012.
74. Nazer JH, Cifuentes L, Aguila A, Juárez ME, Cid MP, Godoy LM, et al. Efecto de la fortificación de la harina con ácido fólico sobre la evolución de las tasas de prevalencia al nacimiento de malformaciones congénitas en los hospitales chilenos del ECLAMC. *Rev Med Chile.* 2007;135:198–204.

75. Ministerio de Desarrollo Social. Una Medición de la Pobreza Moderna y Transparente para Chile, Casen 2013. Santiago, Chile; 2015.
76. Ministerio de Desarrollo Social. Metodología del Diseño Muestral y Factores de Expansión Encuesta de Caracterización Socioeconómica Nacional. 2012;1–118.
77. Ministerio del Interior, Gobierno de Chile. Sistema de consultas estadística de la serie de estudio de drogas en Población General. Available from: <http://www.senda.gob.cl/observatorio/estadisticas/poblacion-general/>
78. Ministerio del Interior y Seguridad Pública (SENDA), Gobierno de Chile. Décimo Primer Estudio Nacional De Drogas En Población General. Observatorio Chileno de Drogas; 2015.
79. Gallegos Ulloa D. Documentación para la Verificación de la Eliminación de Sarampión, Rubéola y Síndrome de Rubéola Congénita (SRC) en Chile. Santiago, Chile; 2011.
80. Ministerio de Salud, MINSAL. Estadísticas Rubeola, Chile 1961-1998.
81. Ministerio de Salud, MINSAL, El vigía 19. 2003.
82. Ministerio de Salud, MINSAL. Normas técnicas de vigilancia de enfermedades transmisibles 1. 2000.
83. Araya B M, Padilla O, Garmendia ML, Atalah E, Uauy R. Prevalence of obesity among Chilean women in childbearing ages. *Rev Med Chil.* 2014;142(11):1440–8.
84. Ministerio de Salud, MINSAL. Factores de riesgo. Santiago, Chile; 2007.
85. Gutierrez R. Linear Mixed Models In Stata. 2006. Available from: <http://www.stata.com/meeting/11uk/gutierrez.pdf>
86. Agenbag JJ, Richardson a. J, Demarcq H, Fréon P, Weeks S, Shillington F a. Estimating environmental preferences of South African pelagic fish species using catch size- and remote sensing data. *Prog Oceanogr.* 2003;59:275–300.
87. Guisan A, Edwards TC, Hastie T. Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: Setting the scene. *Ecol Modell.* 2002;157:89–100.
88. Durbán M. Modelos Aditivos Generalizados con P-splines.
89. Pardo A, Ruiz MÁ, Martín RS. Cómo ajustar e interpretar modelos multinivel con SPSS. *Psicothema.* 2007;19(2005):308–21.
90. Ministerio de Salud, MINSAL. Objetivos Sanitarios de la década 2000-2010. Santiago, Chile; 2010.

91. Ministerio de Salud, MINSAL. Desarrollo de hábitos y estilo de vida saludables, que favorezcan la reducción de los factores de riesgo asociados a la carga de enfermedad de la población. Available from: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/94b4cb1b298526a2e04001011e013430.pdf>
92. Pawluk MS, Campana H, Gili J a, Comas B, Gimenez L, Villalba MJ, et al. Adverse social determinants and risk for congenital anomalies. *Arch Argent Pediatr.* 2014;112(3):215–23.
93. Ministerio de Salud, MINSAL. Objetivos sanitarios para la década 2000-2010. Evaluación en la mitad del período. 2005.
94. Lowry RB, Sibbald B, Bedard T. Stability of Orofacial Clefting Rate in Alberta, 1980–2011. *Cleft Palate-Craniofacial J. The American Cleft Palate-Craniofacial Association;* 2014;51(6):e113–21.
95. Dai L, Zhu J, Mao M, Li Y, Deng Y, Wang Y, et al. Time trends in oral clefts in Chinese newborns: Data from the Chinese national birth defects monitoring network. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol.* 2010;88:41–7.
96. Luo YL, Cheng YL, Gao XH, Tan SQ, Li JM, Wang W, et al. Maternal age, parity and isolated birth defects: A population-based case-control study in Shenzhen, China. *PLoS One.* 2013;8(11):4–9.
97. Herkrath APCDQ, Herkrath FJ, Rebelo MAB, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: A meta-analysis. *J Dent.* 2012;40:3–14.
98. Nazer H J, Cifuentes O L, Águila R A, Ureta L P, Bello P MP, Correa C F, et al. Edad materna y malformaciones congénitas. Un registro de 35 años. 1970-2005. *Rev Med Chil.* 2007;135:1463–9.
99. Series y gráficos de natalidad - DEIS. Available from: http://www.deis.cl/?page_id=3307
100. Borja VH. Estudios ecológicos. *Salud Publica Mex.* 2000;42(6): 533-538.
101. Morgenstern H. Ecologic studies in epidemiology: concepts, principles, and methods. *Annu Rev Public Health.* 1995;16:61–81.
102. Pascal M, Pascal L, Bidondo ML, Cochet A, Sarter H, Stempfelet M, et al. A review of the epidemiological methods used to investigate the health impacts of air pollution around major industrial areas. *J Environ Public Health.* 2013; 2013: 1-17.